

**Radioimmunologische Bestimmungen
von TSH Untereinheiten
bei Schilddrüsenerkrankungen und
endokriner Ophthalmopathie**

Waltraut Eder

1982
—

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK II DES KLINIKUMS GROSSHADERN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. G. PAUMGARTNER

RADIOIMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNGEN VON TSH UNTEREINHEITEN BEI
SCHILDDRÜSENERKRANKUNGEN UND ENDOKRINER OPTHALMOPATHIE

Inaugural Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Waltraut Eder geb. Jansen

aus

Landshut

1980



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-J. Karl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Paumgartner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Januar 1982

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Prof.Dr. H. J. Karl danke ich für die Überlassung
des Themas und für seine wohlwollende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Mann für die
unermüdliche Betreuung der experimentellen Arbeiten
und die zahlreichen Ratschläge und Hilfen bei der
Auswertung und der Zusammenfassung des vorliegenden
Materials.

Für die technische Unterstützung und die stete
Hilfsbereitschaft danke ich Fräulein Neuer, Fräulein
Senfleben, Herrn Huber und Herrn Nilges.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u>	1
2. <u>BIOCHEMIE DER hTSH-UNTEREINHEITEN</u>	2
3. <u>ANTIKÖRPER GEGEN hTSH-UNTEREINHEITEN</u>	3
3.1 Immunisierung	3
3.2 Bindungsfähigkeit der Antiseren	5
4. <u>MARKIERUNG DER hTSH-UNTEREINHEITEN MIT</u> <u>^{125}Jod</u>	12
4.1 Markierungsreaktion	12
4.2 Chromatographie der markierten Antigene	13
4.3 Rechromatographie	14
4.4 Testung der Immunoreaktivität der Fraktionen	19
4.5 Berechnungen zur Markierung	21
5. <u>PRÄZIPITIERENDES ANTI-KANINCHEN-γ- GLOBULIN</u> <u>ANTISERUM ZUR TRENNUNG VON FREIEM UND</u> <u>GEBUNDEMEN ANTIGEN</u>	22
5.1 Immunisierung	23
5.2 Bindungsfähigkeit des Antiserums	23
6. <u>STANDARDKURVEN IN PUFFER UND ANTIGENFREIEM</u> <u>SERUM</u>	27

	Seite
6.1 Standardkurven im Puffer	27
6.2 Standardkurven im Serum	28
7. <u>BEEINFLUSSUNG DER EMPFINDLICHKEIT DER ASSAYS</u>	29
7.1 Tracermengen	29
7.2 Inkubationsvolumina und Proteingehalt	34
7.3 Inkubationszeiten	37
7.4 Inkubationstemperaturen	45
8. <u>SPEZIFITÄT DER ASSAYS</u>	47
8.1 Methode	47
8.2 Untersuchte Hormone	48
9. <u>ANGEWANDTE METHODIK DER RADIOIMMUNOASSAYS</u> <u>FÜR hTSH-a UND hTSH-β</u>	52
10. <u>RECHNERISCHE AUSWERTUNG DER RADIOIMMUNOASSAYS</u>	54
11. <u>QUALITÄTSKONTROLLE DER ASSAYS</u>	58
11.1 Präzision	58
11.2 Richtigkeit	61
12. <u>KLINISCHE ANWENDUNG DER UNTEREINHEITEN-</u> <u>ASSAYS</u>	65
12.1 Patientenkollektive	65
12.2 Methode	67
12.3 Ergebnisse	68
12.4 Klinische Wertung	72

	Seite
13. <u>DISKUSSION DER KLINISCHEN ERGEBNISSE</u>	74
14. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	86
15. <u>LITERATUR</u>	88
16. <u>ANHANG</u>	96
<u>Nomenklatur</u>	96
<u>Puffer Reagenzien</u>	97
<u>Lebenslauf</u>	99



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

In Seren von Patienten, die an primärer Hyperthyreose erkrankt waren, konnten 1973 erstmals frei zirkulierende hTSH-Untereinheiten nachgewiesen werden. Kourides et al. war es gelungen, Radioimmunoassays für hTSH- α und - β zu entwickeln, die bei allen Probanden die α -Einheit, bei hypothyreoten und bei 50 % der normalen Probanden auch die β -Einheit bestimmen konnten. Sie traten gleichzeitig auch den Beweis an, daß keine periphere Dissoziation von Gesamt-TSH für den Anstieg der Untereinheiten nach Stimulation mit TRH verantwortlich ist, sondern daß wahrscheinlich eine hypophysäre Sekretion vorliegt (1, 2, 3).

Eine untere Nachweisgrenze von 5.000 pg/ml für hTSH- β ließ es aber nicht zu, Seren von an Hyperthyreose oder an endokriner Ophthalmopathie Erkrankten zu untersuchen. Um der Bedeutung der Untereinheiten gerade auch bei diesen Patientenkollektiven nachgehen zu können, bestand die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit darin, hochempfindliche, radioimmunologische Bestimmungsmethoden für die α - und β -Untereinheit des Glykoproteinhormons hTSH zu entwickeln, und orientierende Messungen bei unterschiedlichen Schilddrüsenfunktionsstörungen vorzunehmen. Insbesondere wurde untersucht, ob dabei möglicherweise eine inadäquate Sekretion von TSH-Untereinheiten vorliegt.

2. BIOCHEMIE DER hTSH-UNTEREINHEITEN

Das menschliche thyreoideastimulierende Hormon - gebildet in den basophilen Zellen der Adenohypophyse - besteht wie die anderen Glykoproteidhormone (hLH, hFSH, hCG) aus zwei Untereinheiten: Der alpha- und der beta-Kette.

Die Sekretion des Gesamthormons unterliegt einer positiven Steuerung durch den hypothalamischen Transmitter TRH und einem negativen Feed-back durch den freien Anteil der peripheren Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 .

Während die alpha-Einheit aller vier Hormone nahezu identisch ist, unterscheiden sich die beta-Einheiten in ihrer Struktur, und bedingen dadurch die biologische Hormonspezifität. Über endokrinologische Funktionen der Untereinheiten ist bisher nichts Näheres bekannt.

	Molekulargewicht	Zahl der Aminosäuren	Kohlenhydrat-Anteil
alpha-Kette	13.600	89	13,7 %
beta-hTSH	14.700	125	6,0 %

Tab. 1 zeigt die biochemische Zusammensetzung der Glykoproteidhormonkette von TSH (4,5).

Sämtliche Glykoproteide bzw. deren Untereinheiten, die zur Entwicklung dieser RIAs verwandt wurden, waren Präparationen der Fa. Calbiochem, Kalifornien.

3. ANTIKÖRPER GEGEN hTSH-UNTEREINHEITEN

Bei der Entwicklung der Radioimmunoassays standen uns Antikörper aus zwei verschiedenen Quellen zur Verfügung:

1. Lyophilisierter Antikörper gegen hTSH-a und - β der Fa. Calbiochem.
2. Antiserum, das wir selbst durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen hatten = M 3.

3.1 Immunisierung

Das Immunisierungsschema wurde entsprechend Literaturangaben (6 - 9) angewandt.

Ein 3 Monate altes, 3,6 kg schweres, weibliches Neuseeländerkaninchen wurde mit 50 μ g hTSH- β immunisiert.

Das Antigen wurde dazu in 1 ml isotoner Kochsalzlösung steril gelöst und mit 1 ml kompletten Freudschen-Adjuvans und 5 mg abgetöteten Tuberkelbazillen über einen 3-Wege Hahn in 2 Teflon-Spritzen durch einhundertmaliges Hin- und Herziehen vermischt.

Dem Kaninchen wurden Rücken und proximale Extremitäten rasiert, und das Antigen an 20 Stellen streng intradermal injiziert. Zur Steigerung der Immunantwort erfolgte an getrennter Stelle eine intradermale Injektion von 0,5 ml Bordetella-Pertussis-Vakzine.

Nach jeweils 6, 12, 16 Wochen wurde mit 25 μ g hTSH- β - steril emulgiert in 200 μ l 0,9 %iger Kochsalzlösung und 1 ml inkompletten Freudschen-Adjuvans - geboostert.

Zur Titerbestimmung entnahm man 14 Tage nach der jeweiligen Boosterung Blut aus der Ohrrendvene. In Abb. 1 ist die mit jeder Boosterung ansteigende Bindefähigkeit des Antiserum M 3 dargestellt.

Nach weiteren 14 Tagen gewann man das Kaninchenblut quantitativ. Nach i.v. Narkose mit Pentobarbital-Natrium (25 mg Nembutal/kg Körpergewicht) präparierte man die A. carotis communis frei und entblutete über einen Kunststoffkatheter.

Das Antiserum wurde nach der Gerinnung abzentrifugiert und zur Weiterverarbeitung bei -60°C in 50 und 100 μl Portionen tiefgefroren.

Der Antikörper gegen hTSH-a und - β der Fa. Calbiochem wurde in 10 ml einer 2 %igen Kaninchenserum/Puffer I-Lösung (siehe Anhang) verdünnt (= 1 : 10) und ebenfalls in 50 und 100 μl Portionen bei -60°C tiefgefroren.

Mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren wurde stets bei sämtlichen Reaktionsprodukten der Assay vermieden.

3.2 Bindungsfähigkeit der Antiseren

Zur Testung der Antiseren auf Titer, Spezifität und Affinität bediente man sich folgenden Schemas:

200 µl RIA-Verdünnungspuffer II
100 µl Kaninchen-Antiserum
100 µl Tracer-Lösung: ^{125}I - Antigen mit stabilisierendem Kaninchenserum 1 : 200
24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur. Die Röhrchen werden dazu mit Parafilm verschlossen.
100 µl Doppelantikörper in der Verdünnung 1 : 15 für hTSH-a 1 : 10 für hTSH-B

Tab. 2: Pipettier- und Inkubationsschema zur Titerbestimmung

Als Verdünnungsmittel wurde jeweils RIA-Puffer II verwendet (siehe Anhang).

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze 30 Minuten lang bei 3.000 U/min. zentrifugiert. Das Polystyrol-Röhrchen wurde nach Dekantieren mit gefaltetem Saugpapier ausgewischt, um zu gewährleisten, daß nur die Aktivität des Doppelantikörperkomplexes im Bodensatz erfaßt wird. Die verschlossenen Reaktionsgefäße wurden 2 Minuten im Gamma-Counter (Autogamma Berthold) gezählt.

Das jeweilige Ergebnis wurde in Prozent gebundene Aktivität zu Gesamtaktivität ($B/GA \times 100 \% = \text{Bindungskapazität}$) berechnet und auf beiden Koordinaten linear dargestellt.

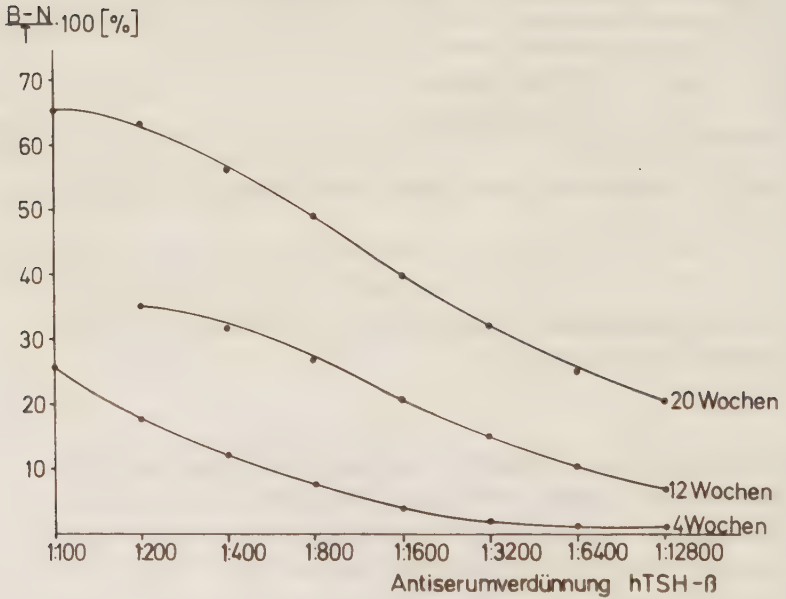


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf des Antikörpertiters von anti-hTSH-β Antiserum M 3.

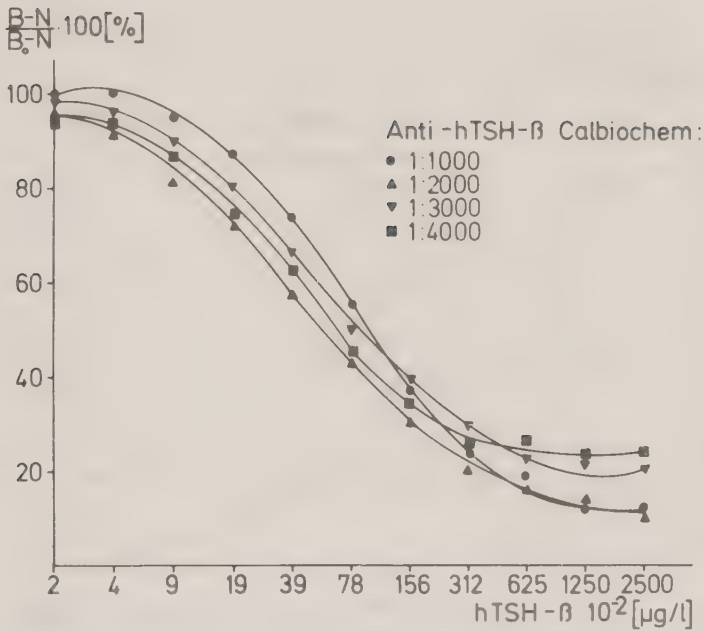


Abb. 2: Änderung der Empfindlichkeit der Standardkurve in Abhängigkeit von der spezifischen Antikörperverdünnung für hTSH-β Calbiochem.

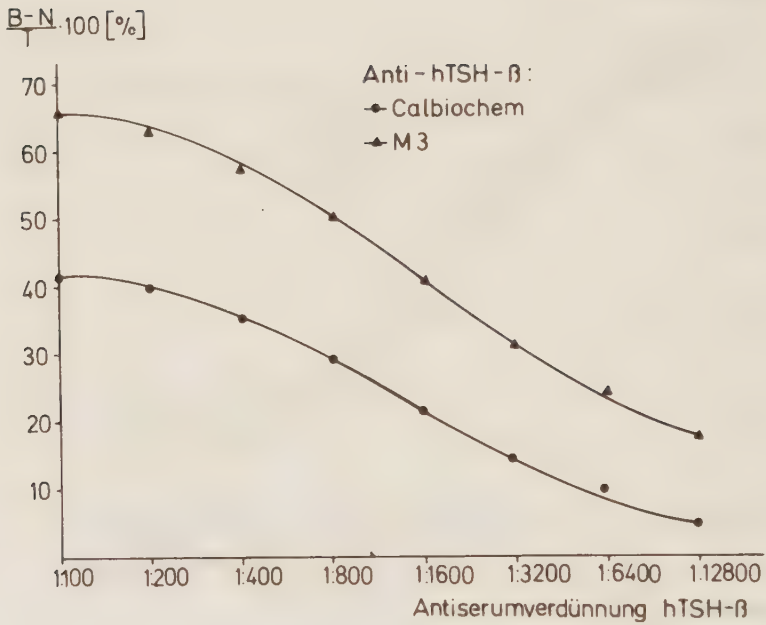


Abb. 3: Titervergleich zwischen den beiden spezifischen hTSH- β Antikörpern M 3 und Calbiochem.

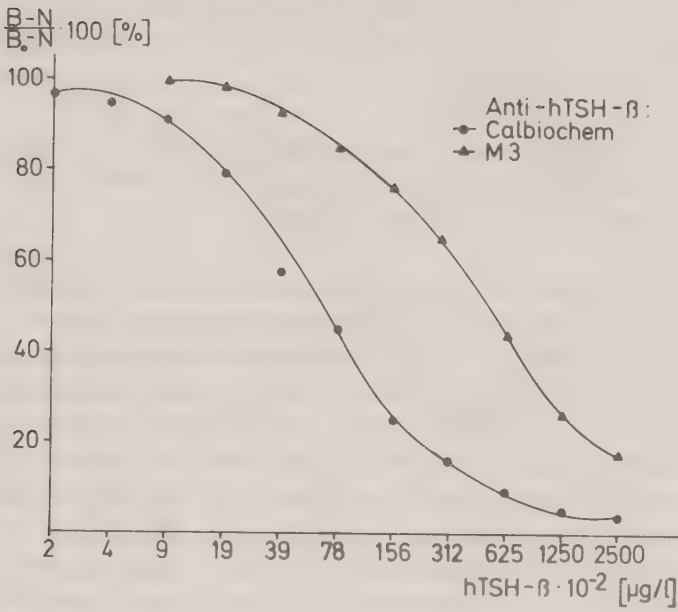


Abb. 4: Vergleich der Empfindlichkeit der Antikörper M 3 und anti-hTSH-β-Calbiochem in einer Standardverdrängungsreaktion

Der Calbiochem hTSH- β -Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1 : 2.000 von der Firma ausgewiesen.

Abb. 2 zeigt die Standardverdrängungsreaktion (z. Technik siehe Punkt 6) des Antikörpers Calbiochem in Abhängigkeit von der Verdünnung des spezifischen Antikörpers. Die unempfindlichste Kurve (1 : 1.000) ist nach rechts verlagert.

Der Titervergleich der beiden Antiseren (Abb. 3) ergab einen geringeren Titer für den Antikörper Calbiochem (1 : 2.000) als für M 3 (1 : 4.000).

Bei der Wertung der Sensitivitäten der beiden Antikörper in einer Standardkurve zeigte sich dagegen bei einer Bindung zwischen 20 - 30 % eine höhere Empfindlichkeit für den Calbiochem-Antikörper (Abb. 4). Als Erklärung hierfür kann angenommen werden, daß aufgrund der genetischen Vielfalt der immunisierten Tiere Antiseren unterschiedlicher Qualität entstehen (10) und in der Fülle der heterogenen Antikörper, die mit dem Antigen unter verschiedenen Gleichgewichtskonstanten reagieren, das selbsthergestellte Antiserum M 3 eine relativ große Anzahl an Antikörpern mit geringem energetischem Potential enthalten muß (11).

Für den hTSH-a Assay stand uns nur der Antikörper Calbiochem zur Verfügung. Standardkurven mit verschiedenen Verdünnungen von anti-hTSH-a wiesen optimale Arbeitstitere bei 1 : 2.000 aus. Abb. 5 zeigt Standardverdrängungen mit anti-a-Calbiochem.

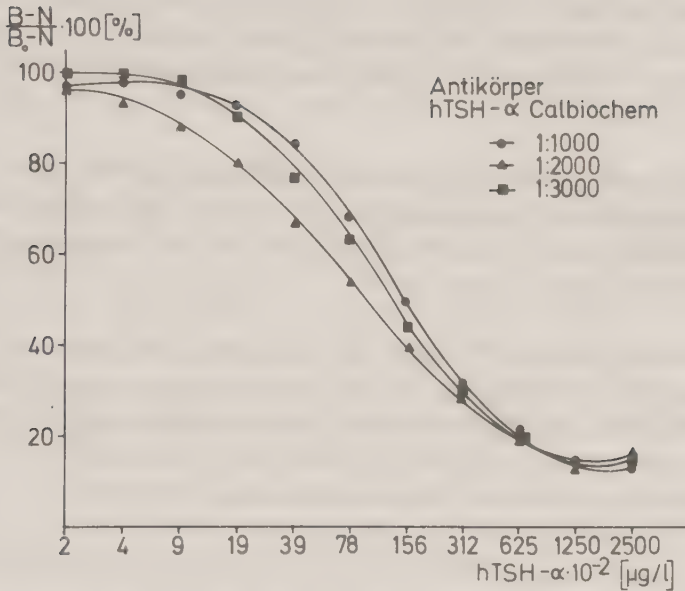


Abb. 5: Änderung der Empfindlichkeit der Standardkurve in Abhängigkeit der spezifischen Antikörperverdünnung für hTSH-α Calbiochem.

4. MARKIERUNG DER hTSH-UNTEREINHEITEN MIT ^{125}JOD

4.1 Markierungsreaktion

Die Markierung der hTSH-Untereinheiten wurde nach der Chloramin-T-Methode von Greenwood und Hunter (12) mit modifizierten Mengen an Reaktionssubstanzen durchgeführt (13).

Als radioaktives Markerpräparat fand $1\text{mCi Na}^{125}\text{I}$ zur Eiweißmarkierung Anwendung, das in $70\text{ }\mu\text{l}$ eines $0,5\text{ M}$ Phosphatpuffers (siehe Anhang) kurz vor der Reaktions-einleitung gelöst wurde.

Sämtliche Lösungen - außer den verwendeten Puffern - wurden erst unmittelbar vor der Markierungsreaktion hergestellt. Wir markierten in Eppendorfgläsern und arbeiteten dabei mit Mikropipetten und Hamilton-Mikroliter-Spritzen. Aktivitätsmessungen nahmen wir direkt am Arbeitsplatz am Geigerzähler vor.

Die Markierung erfolgte nach folgendem Schema:

$30\text{ }\mu\text{l } ^{125}\text{I-Lösung} = 0,4\text{ mCi}$

$10\text{ }\mu\text{l } 0,4\text{ M Phosphatpuffer}$ (siehe Anhang)

$2,5\text{ }\mu\text{g hTSH (a-B)}$ gelöst in $10\text{ }\mu\text{l Puffer I}$

$30\text{ }\mu\text{g Chloramin T}$ gelöst in $10\text{ }\mu\text{l Puffer I}$

Mischen unter vorsichtigem Schütteln auf dem Eppendorf-mixer, Reaktionszeit $17 - 21\text{ Sekunden}$, Reaktion stoppen mit

$50\text{ }\mu\text{g Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ gelöst in $20\text{ }\mu\text{l Puffer I}$

$200\text{ }\mu\text{l Puffer I}$ und $2\text{ \% BSA}$

Das Reaktionsgemisch wurde danach vollständig auf die 1. Säule zur Chromatographie aufgetragen (siehe 4.2). Das Reaktionsgefäß wurde mit

500 µg KI gelöst in 50 µl aqua dest ausgespült.

Nach diesem Schema führten wir vier Markierungen für hTSH-a und sieben Markierungen für hTSH-β durch.

Die spezifische Aktivität lag für hTSH-a zwischen 127 und 146, für hTSH-β zwischen 133 und 205 µCi/µg.

Wir bemühten uns, während aller Markierungen die spezifische Aktivität der Untereinheiten möglichst konstant zu halten, da Untersuchungen am menschlichen Gesamt-TSH erbracht haben, daß zwar die immunologische Aktivität durch hohe spezifische Markierung abnehmen kann (11), und sich niedrig markiertes Hormon gegenüber strahlenchemischer Zersetzung stabiler erweist; jedoch hohe Assayempfindlichkeit nur mit relativ hoher spezifischer Aktivität erreicht werden kann (13, 14).

4.2 Chromatographie der markierten Antigene

Das markierte Material wurde zur Trennung des Hormons vom Jodid über Biogel P 6 chromatographiert.

Biogel P 6 wurde dazu 4 Stunden in Puffer I eingeweicht und vor dem Gießen der Säule durch Anlegen eines Vakuums ausreichend entgast.

Das Gel wurde in eine Glassäule mit 1 cm Durchmesser auf eine Höhe von 13 cm gegossen, und mit Puffer I unter einem Druck von 15 cm Wassersäule äquilibriert (12).

Das Markierungsgemisch und die KI-Spüllösung wurden vollständig auf die Säule übertragen. Als Elutionsmittel diente Puffer I. Pro Fraktion wurden 40 Tropfen des Eluates in ein Eppendorfggefäß, in dem 200 µl Puffer I und 2 % BSA vorgegeben waren, gesammelt. Jede einzelne Fraktion konnte sofort am Geigerzähler gemessen werden.

Abb. 6 und 7 zeigen die Chromatographie-Profile jeweils für hTSH-a und -β über Biogel P 6.

4.3 Rechromatographie

Im Gegensatz zu Arbeiten von Kourides et al.(3) führten wir eine Rechromatographie des Tracers durch.

Sie erfolgte über Biogel P 60 in einer Glassäule mit 1,5 cm Durchmesser bei einem Gel-Stand von 59 cm. Das Gel wurde dazu 12 Stunden bei Raumtemperatur eingeweicht und in der Säule mit 60 ml Puffer I und 0,1 % BSA unter 22 cm Wassersäule äquilibriert.

Die Gipfelfraktion der P 6-Chromatographie wurde aufgetragen und ohne Vorgabe mit Puffer I eluiert, pro Fraktion 50 Tropfen.

Abb. 8 und 9 zeigen die Rechromatographie von hTSH-a und -β über Biogel P 60.

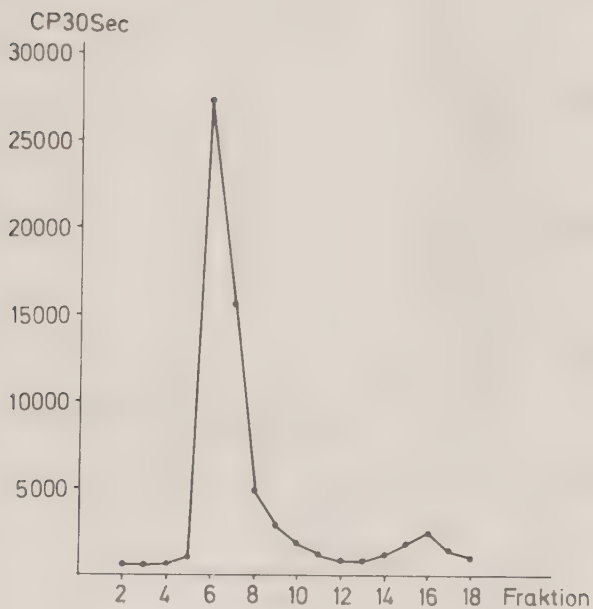


Abb. 6: Fraktionierung des hTSH-a Markierungsge-
misches durch Chromatographie über Biogel P 6

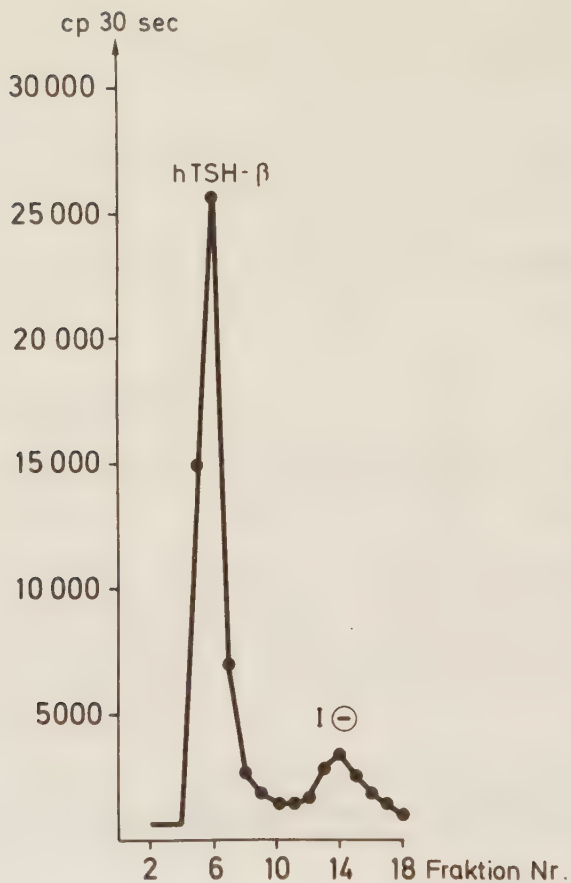


Abb. 7: Fraktionierung des hTSH- β Markierungs-
gemisches durch Chromatographie über Biogel P 6

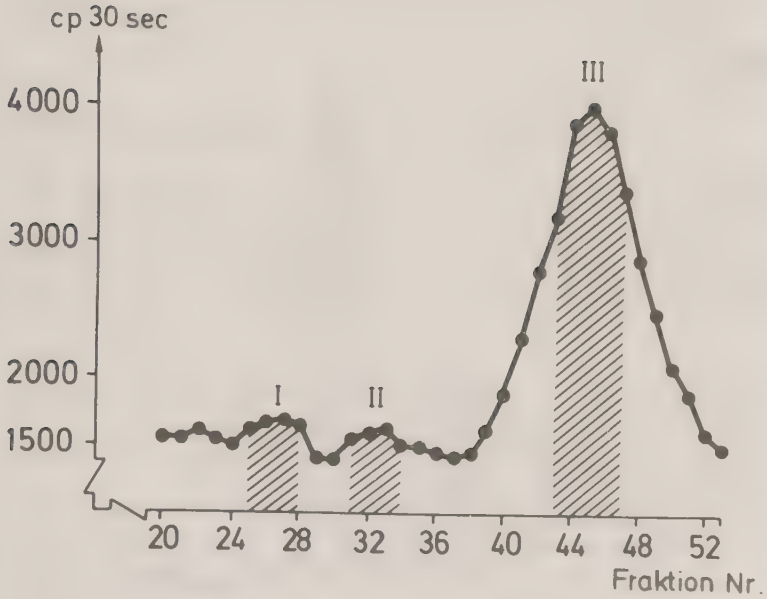


Abb. 8: Fraktionierung des hTSH-a Hormonpeaks durch Rechromatographie über Biogel P 60 mit der Darstellung der drei gepoolten Fraktionen.

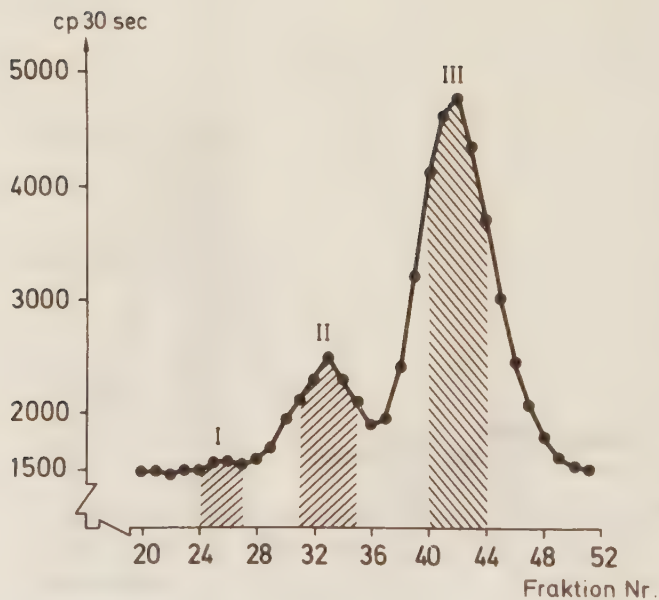


Abb. 9: Fraktionierung des hTSH-β Hormonpeaks durch
Rechromatographie über Biogel P 60 mit der
Darstellung der drei gepoolten Fraktionen.

Die einzelnen Fraktionen wurden gepoolt und mit RIA-Puffer II sofort auf Endverdünnung gebracht (15): Das bedeutet 30.000 Counts/100 μ l / 2 Min. gemessen im Gamma-Counter.

Ein Jodidpeak wurde bei der Rechromatographie nicht mehr gefunden.

4.4 Testung der Immunoreaktivität der Fraktionen

Bei der Prüfung der Immunoreaktivität beurteilten wir die Fähigkeit mehrerer, aus der Rechromatographie gepoolter Fraktionen, sich an den 1. Antikörper zu binden. Es wurde dabei nach dem Pipettier-Schema Tab. 2 vorgegangen.

In Abb. 10 ist die Bindungskapazität der einzelnen Fraktionen einer hTSH- β -Markierung dargestellt.

Dabei erwies sich die Fraktion II geringgradig bindungsfähiger als I und III. Ausschlaggebend für die Auswahl dieses Pools war jedoch die Stabilität gegenüber strahlenchemischen Einflüssen während des Zeitraums, in dem wir mit dem Tracer arbeiteten. Nach 6 - 8 Wochen nahm die Bindungsfähigkeit der II. Fraktion um 15 % ab, bei den übrigen Fraktionen dagegen schon nach 3 Wochen. Zu gleichartigen Ergebnissen kam auch Utiger bei Arbeiten mit Gesamt-TSH (16).

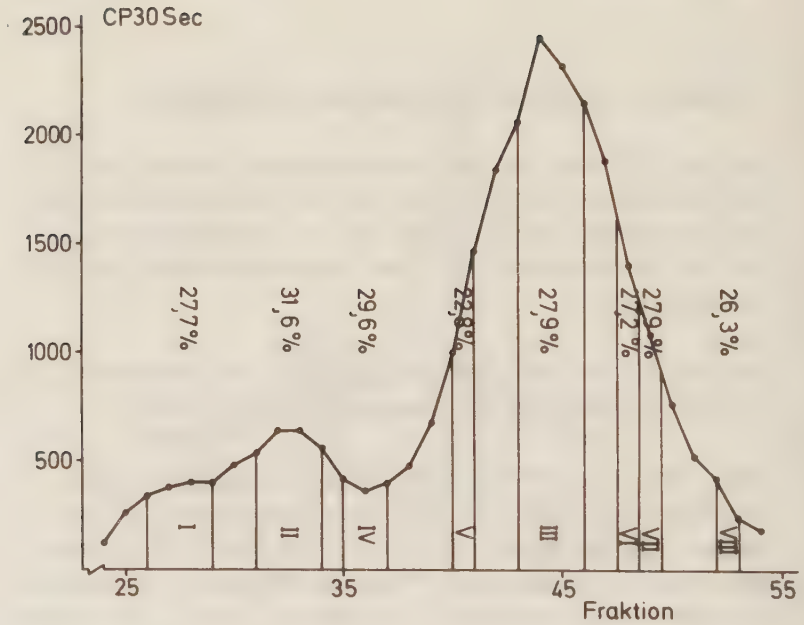


Abb. 10: Bindungsfähigkeit in Prozent der Gesamtaktivität der acht Fraktionen, die sich nach Rechromatographie von hTSH-B über Biogel P 60 poolen lassen.

Aufgrund dessen erachteten wir die Rechromatographie für gerechtsfertig.

Für die Rechromatographien von hTSH-a- β gilt, daß wahrscheinlich der Vorpeak (I) durch Aggregate der markierten Einheiten, der nachfolgende Peak (III) durch Degradierungsprodukte gebildet wird, während sich im mittleren Peak (II) markierte Hormonuntereinheiten zu konzentrieren scheinen (16). Das fast identische Chromatographieverhalten der beiden hTSH-Untereinheiten erklärt sich aus den fast gleichen Molekulargewichten.

Die Fraktionen konnten nicht gegen hTSH-Antikörper geprüft werden. Möglicherweise hätte sich Peak I im heterologen Assay als TSH-Verunreinigung erwiesen.

4.5 Berechnung zur Markierung

Da sich bei der Rechromatographie kein Jodidpeak mehr fand, wurden bei der Berechnung der spezifischen Aktivität die Meßwerte (Counts / 0,5 Min) der 1. Chromatographie zugrundegelegt. Die Restaktivität in der Biogel P 6 Säule wurde nicht erfaßt, da genaue Messungen aus Gründen der Meßplatzgeometrie nicht möglich waren.

Die Berechnung ergab sich aus folgendem Protokoll:

1. Gesamtaktivität zur Markierung / $\hat{=}$ 0,429 mCi

2. Gesamtaktivität der Verluste in
Reaktionsgefäß und Pipettenspitze

2,5 μ g Hormon werden mit 0,429 mCi $\hat{=}$ Counts/0,5 Min. markiert. Wir setzen voraus, daß der Verlust unter 2. zu gleichen Teilen Salz und Hormon betraf.

$$\text{Verlust \%} = \frac{\text{Gesamtaktivität 2.}}{\text{Gesamtaktivität 1.}} \cdot 100 \%$$

3. Eluat des Hormonpeak / $\hat{=}$ mCi
(Addition der Counts
der einzelnen Frak-
tionen)

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\text{mCi des Hormonpeaks}}{2,5 \mu\text{g} - \text{Verluste in } \mu\text{g}}$$

Die Menge an markiertem Hormon pro gepoolter Fraktion wurde aus dem Eluat der P 60-Säule und der Menge an zugesetztem RIA-Puffer errechnet. Als gebrauchsfertige Verdünnung strebten wir 30.000 C/ml Tracer / 2 Min. Zählzeit an.

4. Gipfelfraktion des Hormonpeaks / $\hat{=}$... μg Hormon
von Biogel P 6

5. Eluat der Rechromatographie / $\hat{=}$... Hormon-
(Addition aller Einzel- menge unter 4.
fraktionen)

Die Hormonmenge der gepoolten Fraktion ergab sich aus der Addition der Einzelfraktionen und der Menge an zugesetztem Puffer.

$$\text{Hormonmenge in } \mu\text{g/ml} = \frac{\text{Hormonmenge } \mu\text{g/Fraktion}}{\text{Menge des RIA-Puffer}}$$

$$\text{Hormonmenge } \mu\text{g/Fraktion} \hat{=} \text{addierte Counts}$$

Daraus ergaben sich für hTSH-alpha Mengen von 433 pg bis 1,64 ng/ml, für hTSH-beta 500 pg bis 1,01 ng/ml Tracer.

5. PRÄZIPITIERENDES ANTI-KANINCHEN- γ -GLOBULIN ANTISERUM ZUR TRENNUNG VON FREIEM UND GEBUNDENEM ANTIGEN

Zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Antigen wählten wir bei der Entwicklung dieser Assays die Doppelanti-

Körpermethode (17) mit nachfolgender Zentrifugation. Der lösliche Komplex aus Hormon und spezifischem Antiserum wird durch einen zweiten Antikörper, der gegen Kaninchengamma globulin gerichtet ist, zur Präzipitation gebracht und dann quantitativ abgetrennt.

5.1 Immunisierung (6 - 9)

Wir immunisierten eine junge Ziege mit lyophilisiertem, reinem Gamma globulin aus Kaninchenserum.

1 mg Gamma globulin - emulgiert in 1 ml 0,9 % steriler Kochsalzlösung und 1 ml komplettem Freudschen Adjuvans - wurde an 3 Stellen am rasierten und desinfizierten Rücken subcutan injiziert. Nach 4 Wochen erfolgte eine Boosterung mit der gleichen Antigenmenge - diesmal aber in 1 ml inkomplettem Freudschen Adjuvans - und nach weiteren 4 Wochen nochmals mit der halben Emulsionsmenge.

10 Wochen nach der Erstimmunisierung ergaben Antikörpertiterbestimmungen im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (18) eine Präzipitationslinie bis zu einer Verdünnung von 1 : 32.

Danach wurde die Ziege entblutet, und das Serum nach Zentrifugation bei -60°C in 5 ml Portionen tiefgefroren.

5.2 Bindungsfähigkeit des Antiserums

Nach dem Pipettierschema in Punkt 3.2 wurden in 3-fach Proben Doppelantikörperversdünnungen ausgetestet.

Die Abb. 11 und 12 zeigen die Bindungskapazitäten in den Assays in Abhängigkeit vom 2. Antikörper und Zusatz von stabilisierendem Kaninchenserum.

Im alpha-Assay entschieden wir uns für die Verdünnung 1 : 15 - im beta-Assay für 1 : 10 und den Zusatz von stabilisierendem Kaninchenserum zum Tracer von jeweils 1 : 200.

Zur Hemmung des Komplementsystems im Serum oder Plasma, das die Präzipitation des Doppelantikörperkomplexes verhindern kann, wurde der Verdünnungspuffer mit dem Ca-Antagonisten EDTA 0,01 M/l versetzt. Eine Beeinträchtigung der Reaktion Antigen - 1. Antikörper fanden wir nicht (10, 17).

Entscheidend für die Anwendung der Doppelantikörpermethode erwies sich - wie Hunter (17) durch Versuche zeigen konnte - der Zusatz von stabilisierendem, nicht immunaktivem Serum derjenigen Tierspezies, das den 1. Antikörper stellt.

Das niedrig verdünnte, normale, nicht spezifische kaninchenserum bewirkt eine Stabilisation des Ag-Ak-Komplexes und ermöglicht damit eine verbesserte Präzipitation und Zentrifugation.

Die unspezifische Bindung des Doppelantikörpers, die in Abwesenheit von 1. Antikörper erfolgt, betrug (in Prozent der markierten Antigenmenge) :

für alpha	in Puffer	2,6 - 5,8 %
	in Serum	3,4 - 7,2 %
für beta	in Puffer	4,4 - 4,8 %
	in Serum	4,4 - 8,2 %

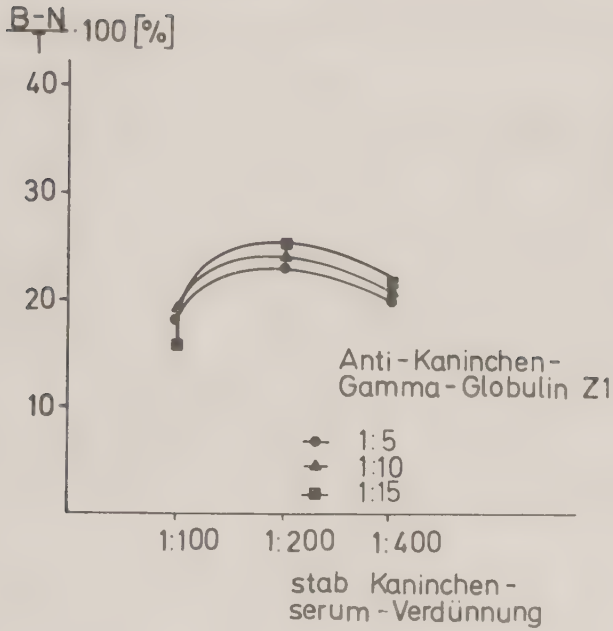


Abb. 11: Bindungsfähigkeit im hTSH-a Assay in Abhängigkeit von stabilisierendem Kaninchen- und Doppelantikörperverdünnung

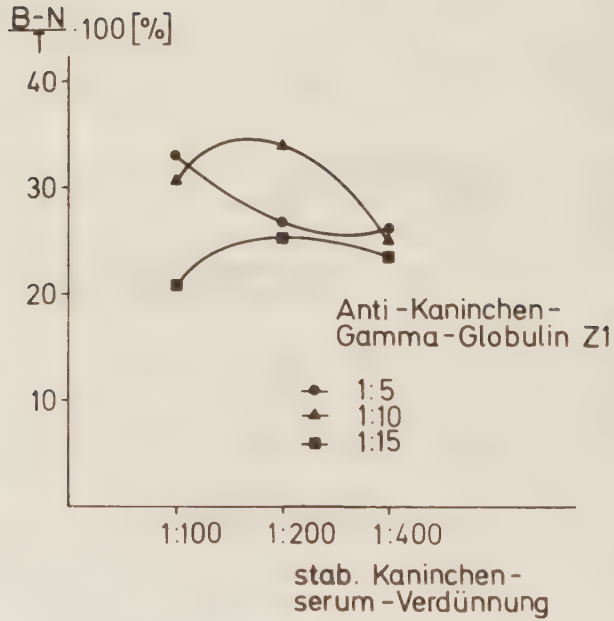


Abb. 12: Bindungsfähigkeit im hTSH- β Assay in Abhängigkeit von stabilisierendem kaninchenserum und Doppelantikörperverdünnung

6. STANDARDKURVEN IM PUFFER UND ANTIGENFREIEM SERUM

6.1 Standardkurven im Puffer

Jede Standardkurve wurde nach folgendem Prinzip erstellt (10, 12, 16):

Der 1. Antikörper wird in der Verdünnung gewählt, bei der er in Titerversuchen etwa 30 % der maximalen Bindung erzielte. Zu einer definierten Menge radioaktiven Antigens wird dem Ansatz unmarkiertes Antigen in einer Verdünnung zugesetzt. Nach dem Massenwirkungsgesetz konkurrieren beide Antigene um die Bindungsstellen des Antikörpers. Mit steigender Menge an Standardsubstanz wird radioaktives Antigen vom Antikörper verdrängt.

Die Hormon-Standardsubstanzen stammten wie die zu markierenden Antigene aus Präparationen der Fa. Calbiochem. Mit einer Anfangskonzentration von 10 ng/100 µl stellten wir in 5 %igem BSA-Puffer Verdünnungsreihen her. Mit 13 verschiedenen Konzentrationen erfaßten wir einen Bereich von 5 ng bis 1,22 pg/100 µl. Die Verdünnungen konnten bei Kühlschranktemperaturen bis zu 6 Wochen aufbewahrt werden.

Als wichtige Bezugspunkte für die Auswertung jeder Standardkurve sind N - und B_0 - Werte zu nennen.

Durch die B_0 -Werte wird die maximale Bindung des jeweiligen Assays ermittelt, da hier kein unmarkiertes Antigen zugesetzt wird, das den Tracer verdrängen könnte. Mit den N -Werten erfaßt man die unspezifische Bindung (zur Technik siehe Punkt 8). Beide Probenansätze - sowohl B_0 , als auch N - wurden durch Puffer soweit ergänzt, daß

sie gleiche Inkubationsvolumina wie die Standardsätze enthielten.

Zur Auswertung der Standardkurven wählten wir die Berechnung der antikorpergebundenen Impulse, bezogen auf B_0 als 100-Prozentwert. Die graphische Darstellung erfolgte halblogarithmisch: auf der Abszisse erscheinen die Konzentrationen logarithmisch, auf der Ordinate der B/B_0 -Quotient linear. Daraus ergibt sich ein sigmaförmiger Kurvenverlauf.

Zur Methodik der Berechnung und Auswertung: siehe 10.

6.2 Wiederfindekurven im Serum

Ziel der Wiederfindekurven ist es, eine weitgehende Annäherung von Standardkurven im Puffer - zu solchen im Serummilieu zu erzielen, damit realistische Maßstäbe für spätere Messungen gelten. Will man mit Standardkurven Bedingungen der Patienten-Plasma-Proben simulieren, sollte die Diskrepanz sowohl zwischen Menge, als auch Art des Eiweißgehaltes möglichst gering sein, um Fehlermöglichkeiten im Antigen-Antikörper-System zu vermeiden (10, 11).

Ansätze der Standardkurven in antigenarmen Plasma erwiesen sich als unzureichend. Wir verzeichneten nicht nur einen hohen Basalgehalt an hTSH-Untereinheiten, sondern auch mit steigender Standardmenge zunehmende Abweichungen.

Eine befriedigende Annäherung der Standardkurven wurde erst durch Hinzufügen von Kalberserum zu den Ansätzen erreicht. Bovine TSH-Einheiten zeigten trotz Ähnlichkeit

ten in der biologischen Aktivität nur geringe immunologische Kreuzreagibilität (4).

Abb. 27 (in Punkt 10) zeigt nach Spline geplottete Standardkurven in Puffer und antigenfreiem Serum.

Für die Serum-Standardkurve wurde dadurch ein Reaktionsmilieu geschaffen, das im Vergleich zur Patienten-Plasma-Probe fast denselben Eiweißgehalt aufweist, und dennoch durch geringe Einflußnahme auf die Reaktionsprodukte keinen Basalgehalt an hTSH-Untereinheiten vortauscht.

BEINFLUSSUNG DER EMPFINDLICHKEIT DER ASSAYS

Die Empfindlichkeit oder Sensitivität eines Assays ist definitionsgemäß die kleinste Menge von unmarkiertem Hormon, die von nicht vorhandenem Hormon unterschieden werden kann (15).

1 Tracermengen

Die Reduzierung der Tracermengen bedeutet eine Steigerung der Sensitivität eines RIA (10, 17) unter der Voraussetzung, daß das markierte Hormon noch über eine ausreichend hohe spezifische Aktivität verfügt (15).

Nach dem Pipettierschema in 3.2 (Tab. 2) wurden steigende Tracerkonzentrationen auf ihre Affinität zum Antiserum überprüft. Abb. 13 zeigt unterschiedliche Tracermengen im α -Assay in Abhängigkeit zur maximal messbaren Impulsrate der jeweiligen Tracerkonzentration (Total). In Abb. 14 sind analoge Ergebnisse im β -Assay aufgezeichnet.

Um für die Versuche gleiche Inkubationsvolumina zu erhalten, wurde die zu prüfende Tracermenge mit RIA-Puffer II ohne EDTA jeweils auf 100 μ l ergänzt.

Maximale Bindungsraten, die für den Assay gute Empfindlichkeit bedeuten, wurden bei sehr niedrigen Tracermengen $\hat{=}$ geringe Impulsrate erreicht. Die Zahl der Impulse ist aber in der Standardkurve für die Reproduzierbarkeit des RIA mitverantwortlich. Deshalb wählten wir die geringstmögliche Tracermenge, die eine noch ausreichend hohe Impulsrate ergab: Für beide TSH-Untereinheiten jeweils 50 μ l Tracer.

Abb. 15 zeigt die höhere Empfindlichkeit der Standardverdrängungsreaktion bei 50 μ l hTSH- β verglichen mit anderen Antigenmengen - kenntlich an der Linksverschiebung und der größeren Steilheit der Sigmakurve.

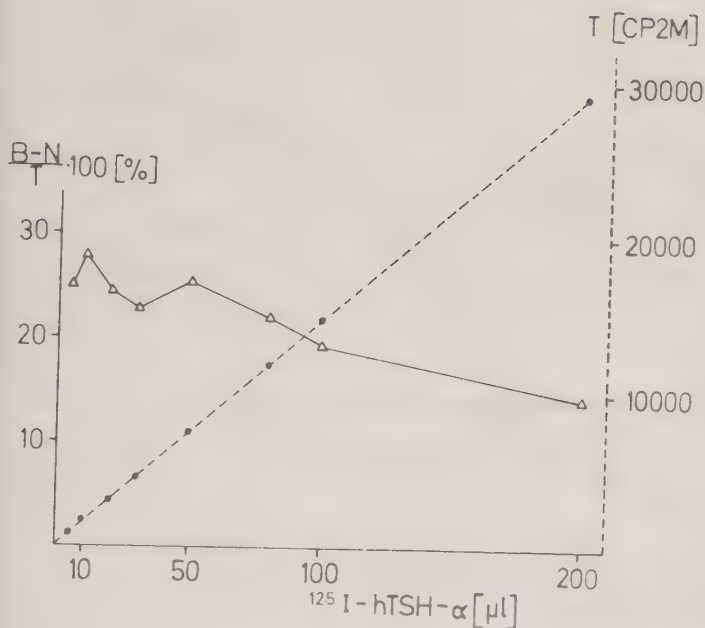


Abb. 13: Affinität von hTSH-a zum spezifischen Antikörper in Abhängigkeit von der eingesetzten Tracerkonzentration. Die Gerade stellt die maximal messbare Impulsrate der entsprechenden Antigenkonzentration dar.

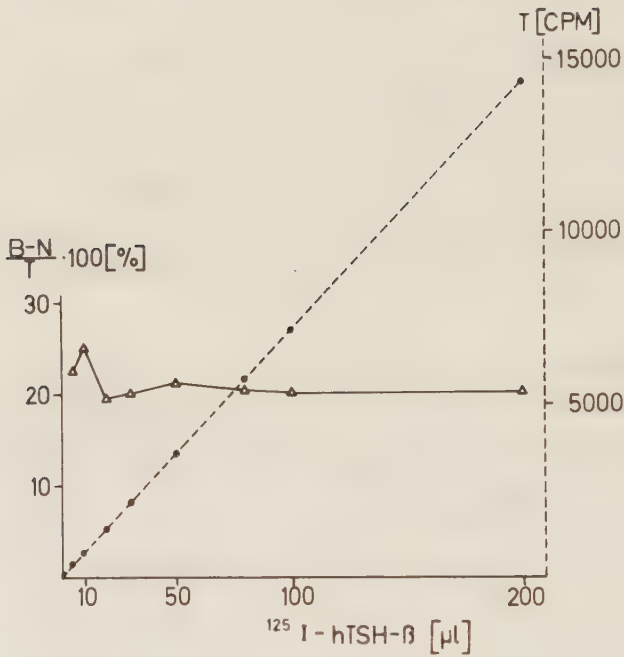


Abb. 14: Affinität von hTSH-B zum spezifischen Antikörper in Abhängigkeit von der eingesetzten Tracerkonzentration. Die Gerade stellt die maximal meßbare Impulsrate der entsprechenden Antigenkonzentration dar.

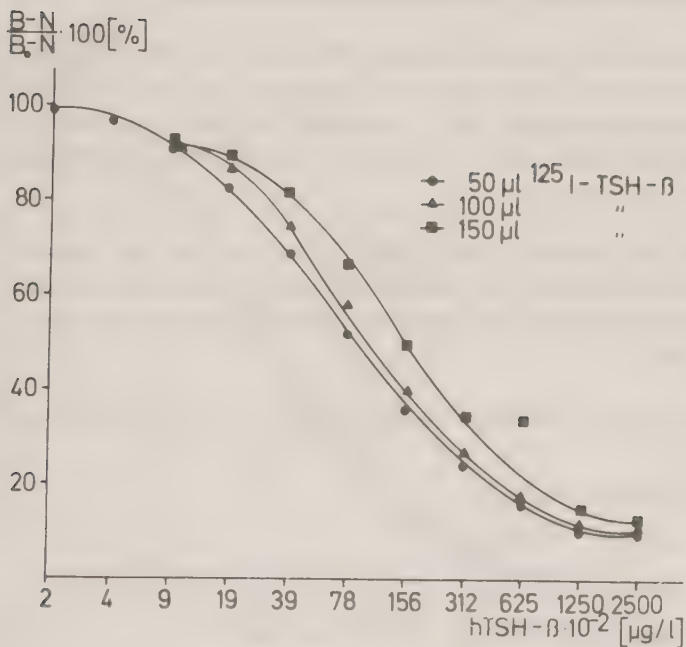


Abb. 15: Empfindlichkeit der hTSH- β Standardkurve in Abhängigkeit von der Tracerkonzentration

7.2 Inkubationsvolumina und Proteingehalt

Als weitere wichtige Faktoren zur Steigerung der Empfindlichkeit gelten Inkubationsvolumen und Proteingehalt. Eine Vergrößerung des Volumens und ein annähernd neutrales Reaktionsmilieu verbessern nicht nur die untere Nachweisgrenze (17), sondern bewirken auch eine vollständigere Fällung im Doppelantikörpersystem (10, 15).

Zur Vermeidung unspezifischer Störfaktoren auf die Sensitivität - u. a. Adsorption von Peptiden an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes, pH - Unterschiede der Pufferkurve zur Wiederfindekurve - empfiehlt es sich, das Puffermilieu mit BSA anzureichern.

Dem bovinen Serumalbumin wurde im Vergleich zum humanen der Vorzug gegeben, da bei HSA-Präparationen die Gefahr der Kontamination mit alpha-Glykoproteid-Einheiten besteht (19).

Wir verglichen Ansätze mit vorgegebenen Inkubationsvolumina von:

1. 100 μ l 1 % BSA
2. 100 μ l 5 % BSA
3. 100 μ l 1 % BSA + 100 μ l 1 % BSA
4. 100 μ l 1 % BSA + 100 μ l 5 % BSA
5. 100 μ l 1 % BSA + 100 μ l Kälberserum

Abb. 16 zeigt Standardkurven für hTSH-a und

Abb. 17 für hTSH-B jeweils in den Ansätzen 3, 4, 5.

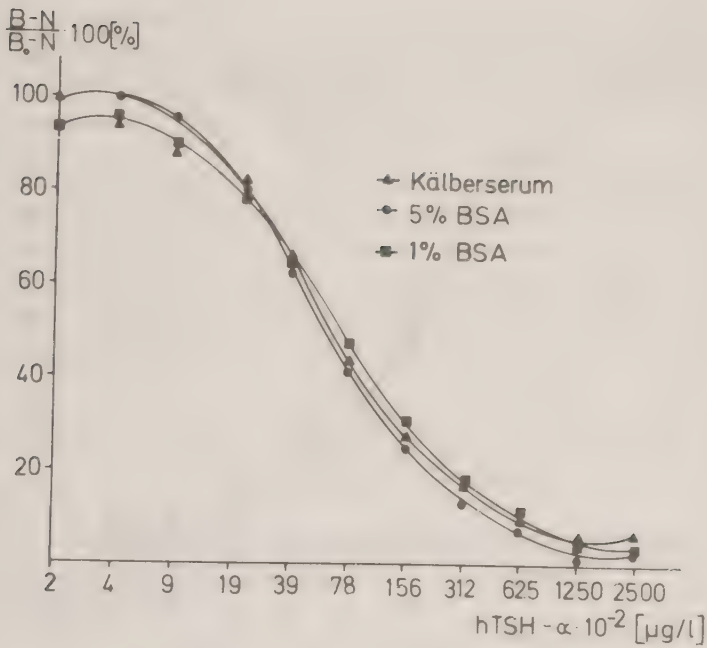


Abb. 16: Abhängigkeit der Empfindlichkeit der Standardkurve für hTSH-a vom Proteingehalt des Inkubationsvolumens.

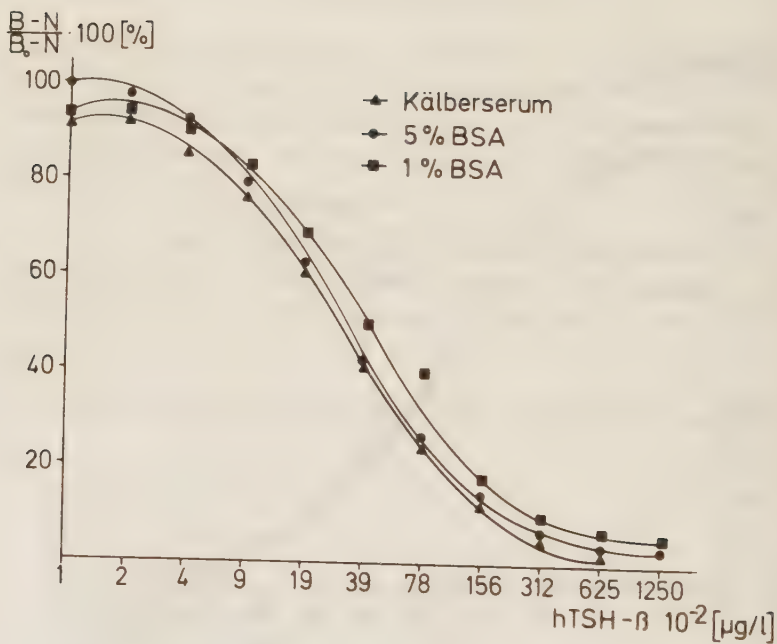


Abb. 17: Abhängigkeit der Empfindlichkeit der Standardkurve für hTSH-β vom Proteingehalt des Inkubationsvolumens.

Wir entschieden uns für ein Inkubationsvolumen von 100 μ l 1 % BSA + 100 μ l 5 % BSA für die Pufferkurven, im Vergleich zu jeweils 100 μ l 1 % BSA + 100 μ l Kälberserum für die Wiederfindekurve.

7.3 Inkubationszeiten

Als entscheidender Schritt zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wird in der Literatur die "kalte Vorinkubation" mit einer 2 - 4fachen Verbesserung der Empfindlichkeit angesehen (15, 17).

Man gibt dabei der Bindung von unmarkiertem Standard oder unbekannter Probe an das Antiserum den Vorrang und setzt das markierte Antigen erst nach Stunden zu, das sich jetzt erst an freigebliebene Stellen des Antikörpers binden kann. Die Empfindlichkeit wird erhöht, weil die Bindung des unmarkierten Antigens favourisiert wird (15).

Abb. 18 zeigt die Auswirkung der verspäteten Zugabe des Tracers nach 0, 2, 16, 24, 48 Stunden im α -Assay; Abb. 19 nach 0, 2, 4, 24, 48 Stunden im β -Assay.

Bei beiden Assays zeigte sich nach 48 Stunden kalter Vorinkubation maximale Steilheit der Kurven.

Längere Vorinkubation würde die Gefahr der Hormonzerstörung durch Plasmaproteine vergrößern (10), aber auch den Assay zeitlich schwer durchführbar machen.

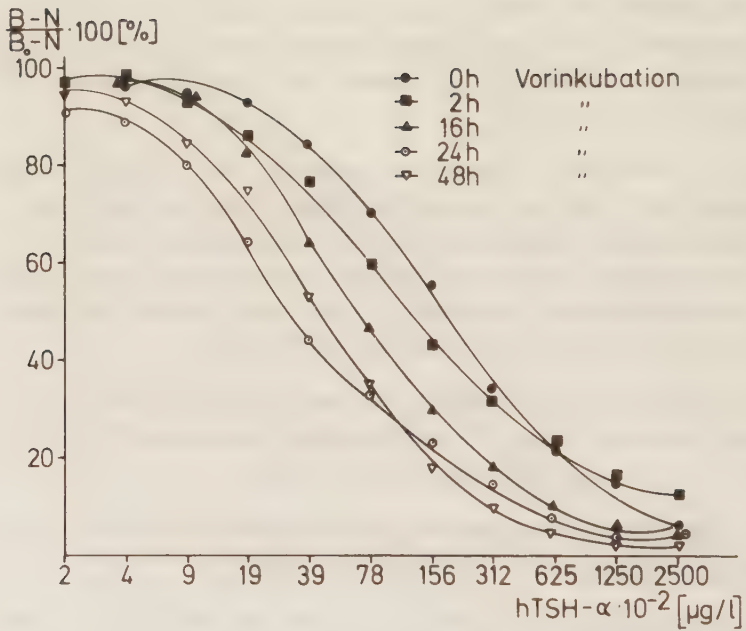


Abb. 18: Empfindlichkeit der hTSH- α Standardkurve in Abhängigkeit von "kalter Vorinkubation" über 0, 2, 16, 24, 48 Stunden.

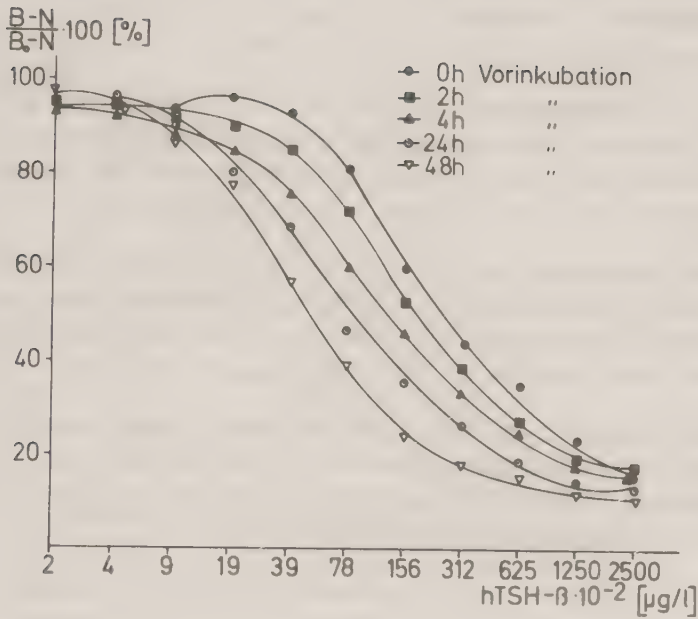


Abb. 19: Empfindlichkeit der Standardkurve für hTSH-β nach "kalter Vorinkubation" über 0, 2, 4, 24, 48 Stunden.

Neben der Vorinkubation nimmt auch die Dauer der Tracerinkubation auf die Empfindlichkeit Einfluß, da die ^{125}I -Exposition auf die immunologische Aktivität einwirken kann, und das Gleichgewicht zwischen Dissoziation und Zerstörung verschieben kann (13).

Wir ließen dazu im a-Assay nach 48-stündiger Vorinkubation den Tracer 0, 1, 4, 16, 24, 48 Stunden einwirken - dargestellt in Abb. 20 - im β -Assay dagegen über 1, 4, 16, 24, 48 Stunden - in Abb. 21.

Angeichts der geringen Unterschiede zwischen 24 und 48 Stunden Tracerinkubation entschieden wir uns im Hinblick auf eine bessere Durchführbarkeit der Assays jeweils für eine 24-stündige Tracerinkubation.

Die Präzipitation mit 2. Antikörper ist eine relativ schnell verlaufende Reaktion. Wir bestimmten dazu an einem Standardpunkt (39 pg/100 μl) optimale Inkubationszeit und -temperatur für beide Assays.

Abb. 22 zeigt im a-Assay das Ergebnis einmal bezogen auf maximal mögliche Gesamtaktivität (=Total), zum anderen bezogen auf den Standardleerwert B_0 ; Abb. 23 zeigt Entsprechendes im β -Assay.

Nach 4 Stunden war die maximale Fällung im Albuminpuffer erreicht. Da die Präzipitation im Serum in der Regel noch schneller verläuft (14) erschienen uns 4 Stunden Inkubationszeit im Serumansatz ebenfalls für ausreichend. Zur Temperaturabhängigkeit s. 7.4

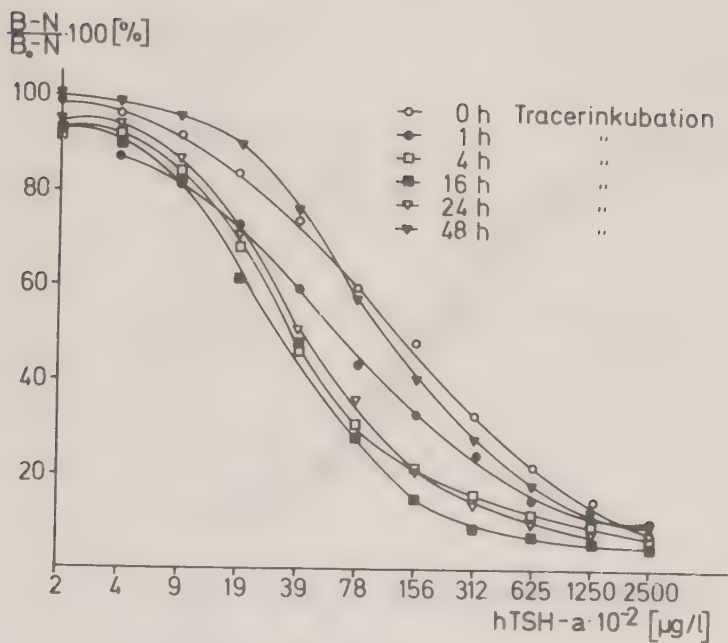


Abb. 20: Verlauf der hTSH-a Standardkurve in Abhängigkeit von der Tracerinkubation über 0, 1, 4, 16, 24, 48 Stunden.

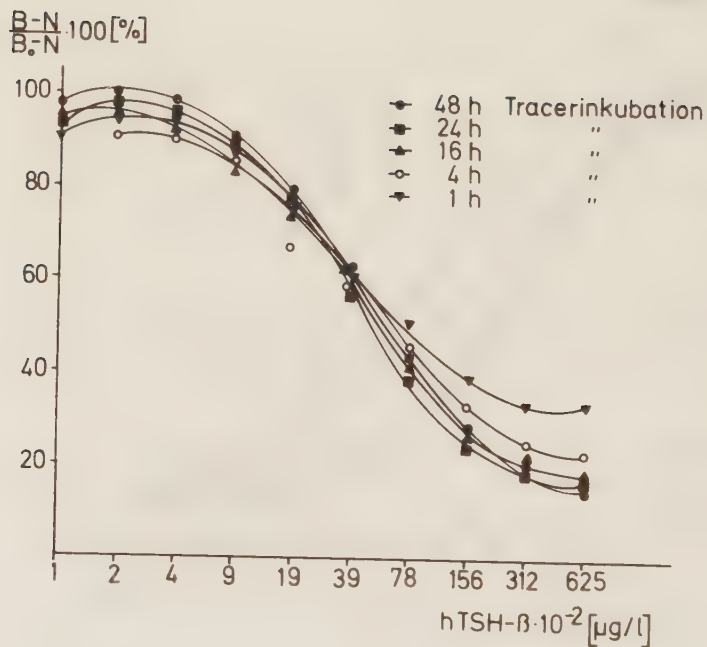


Abb. 21: Verlauf der hTSH-β Standardkurve in Abhängigkeit von der Dauer der Tracerinkubation über 1, 4, 16, 24, 48 Stunden.

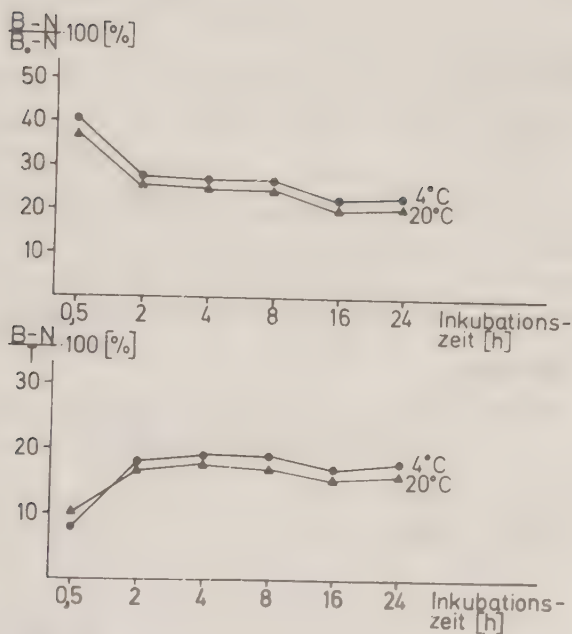


Abb. 22: Abhängigkeit der Doppelantikörper-Präzipitationsreaktion von Inkubationszeit und -temperatur bei 39 pg/100 µl für hTSH-a. Als Bezugspunkt ist im oberen Teil der Abbildung der Standardleerwert B_0 , im unteren Teil die maximal mögliche Gesamtaktivität T gewählt.

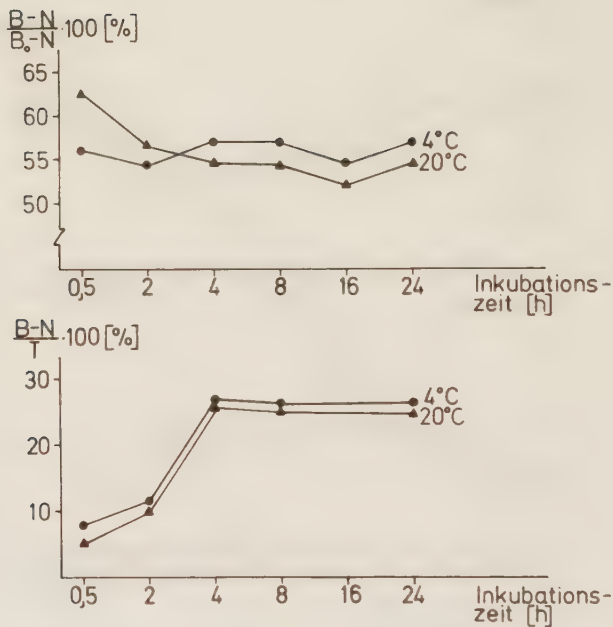


Abb. 23: Abhängigkeit der Doppelantikörper-Präzipitationsreaktion von Inkubationszeit und -temperatur für hTSH- β bei 39 pg/100 μ l. Als Bezugspunkte sind wieder B_0 und T gewählt.

7.4 Inkubationstemperatur

Über die optimale Reaktionstemperatur für einen Radioimmunoassay existieren in der Literatur unterschiedliche Ansichten. Während hohe Temperaturen ($= 37^{\circ}\text{C}$) einheitlich wegen Verlust an immunologischer Aktivität abgelehnt werden, liegen unterschiedliche Erfahrungen über Kinetiken bei 4°C und 20°C vor (4, 13, 14, 17).

Wir testeten dazu im hTSH- β RIA Vorinkubationen über 4, 24, 48 Stunden bei 4°C (Kühlschrank) und 20°C (Raumtemperatur) aus.

Abb. 24 zeigt, daß die Kurven bei Raumtemperatur empfindlicher waren als bei Kühlschranktemperatur. Im Vergleich zu 4°C wird offenbar das Gleichgewicht zwischen Reaktion und Dissoziation bei 20°C innerhalb der 48-stündigen Inkubation erreicht.

Die maximale Fällung mit dem 2. Antikörper wird in beiden Assays bei 4°C erreicht (vgl. Abb. 22 und 23).

Die hohe Präzipitation nach 30 Minuten ließen wir unberücksichtigt, da uns dieser kurze Zeitraum bei hohen Probenzahlen nicht realisierbar schien.

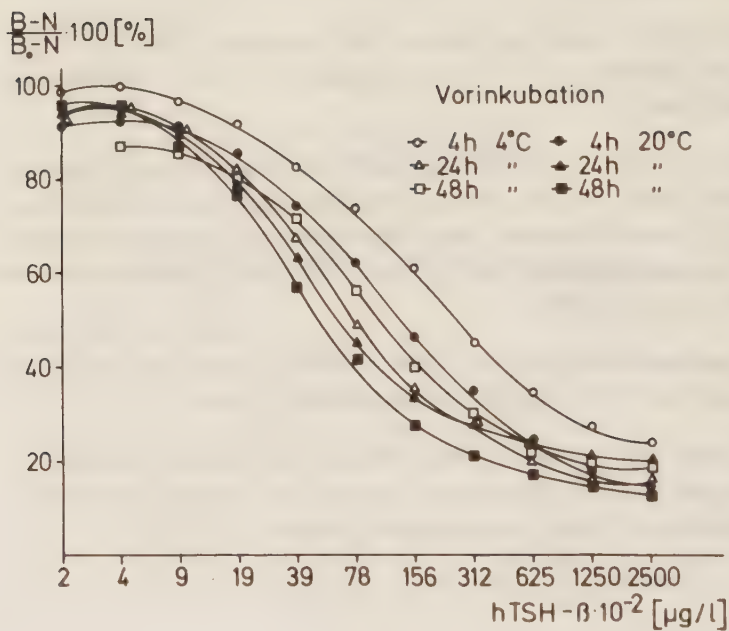


Abb. 24: Empfindlichkeit der htSH- β Standardkurve in Abhängigkeit von Dauer der "kalten Vorinkubation" und Inkubationstemperatur.

8. SPEZIFITÄT

Die Spezifität eines Radioimmunoassay ist definiert als Grad der Unabhängigkeit von Einflüssen, die die Messung des gesuchten Antigens beeinträchtigen können. Sie hängt ab von der Homogenität des markierten Antigens, von unspezifischen Einflüssen auf die Antigen-Antikörper-Reaktion (Zerstörung des Antigens durch Jodierung und Inkubation). Als entscheidender Faktor für Spezifität werden jedoch Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen oder antigen wirksamen Produkten, die um Bindungsstellen am Antikörper konkurrieren, angesehen.

Kreuzreaktionen können

- durch Hormone verschiedener Spezies:
z.B. bovines TSH,
- durch Ähnlichkeit homologer Hormone:
FSH, LH, HCG,
- durch Hormonabbauprodukte verursacht sein.

Als Maß für unspezifische Faktoren wurden in jedem Assay N-Werte, das sind Reaktionsprodukte des 2. Antikörpers mit Antigen und Puffer-Serumkomponenten in Abwesenheit von 1. Antikörper, als unspezifische Bindungswerte mitgemessen und von allen ermittelten Werten als Hintergrundwerte abgezogen (10). (s. 5.2 und 6.1).

8.1 Methode

Zur Austestung gelangten alle uns verfügbaren Hypophysenglykoproteinhormonpräparationen.

Die Präparationen wurden unter gleichen Bedingungen wie hTSH-a und -B gelöst und in Verdünnungen von 9 pg -

160 ng/100 µl als unmarkiertes Antigen im hTSH-a und -β-RIA eingesetzt. Der Grad der Kreuzreaktion errechnete sich dann daraus, wieviel kreuzreagierendes Material nötig war, um die gleiche dosisabhängige Kurve zu ergeben (20).

$$\frac{x}{y} \cdot 100 = \text{Kreuzreaktion in Prozent}$$

X = Gewicht der zu bestimmenden Substanz

Y = Gewicht der kreuzreagierenden Substanz,
die jeweils 50 % Tracerbindung bewirkt.

8.2 Untersuchte Hormone

Im hTSH-a-Assay wurde untersucht:

b	TSH	-	National Institute of Arthritis, Metabolic and Digestive Diseases, N.I.H. Bethesda M. d. USA
h	TSH	-	Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 629999
h	TSH β	-	Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 520023
h	LH	-	Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 389557
h	LH a	-	Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 389532
h	LH β	-	Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 389563
h	FSH	-	Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 620016

Im hTSH-β-Assay wurden untersucht:

b	TSH	s.o.
h	TSH	s.o.
h	TSH a	- Fa. Calbiochem, California Lot Nr. 420022

h LH	s.o.
h LH a	s.o.
h LH β	s.o.
h FSH	s.o.

Abb. 25 zeigt die Kreuzreaktionen im hTSH-a-Assay, und
Abb. 26 zeigt die Kreuzreaktionen im hTSH-β-Assay.

Es ließen sich folgende Werte ermitteln:

für hTSH-a:	mit bovinem TSH:	0,3 %
	humanem TSH:	4,8 %
	humanem TSH β:	6,1 %
	humanem LH:	22,0 %
	humanem LH a:	100,0 %
	humanem LH β:	1,0 %
	humanem FSH:	7,9 %
für hTSH-β:	mit bovinem TSH:	0,03 %
	humanem TSH:	3,8 %
	humanem TSH a:	1,6 %
	humanem LH:	0,06 %
	humanem LH a:	0,06 %
	humanem LH β:	1,8 %
	humanem FSH:	1,0 %

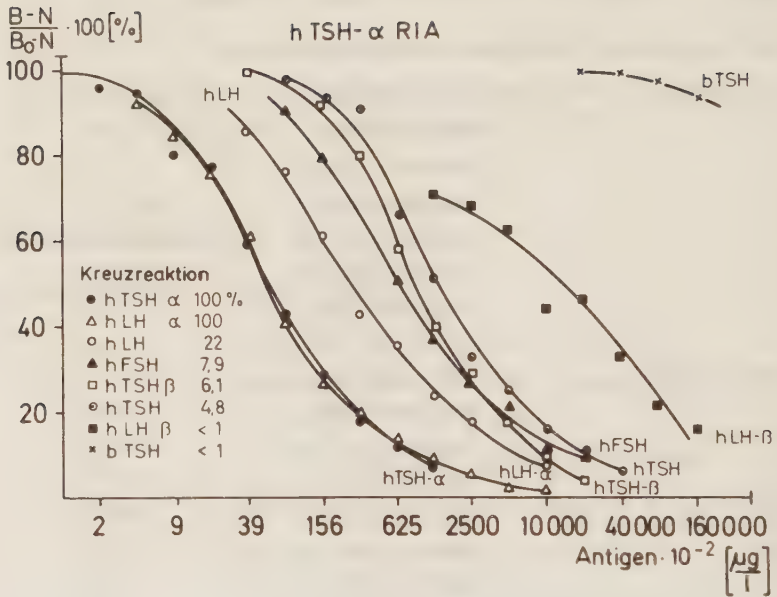


Abb. 25: Vergleich der hTSH-a Standardkurve mit Verdrängungsreaktionen durch bTSH, hTSH, hTSH- β , hLH, hLH-a, hLH- β , hFSH im heterologen hTSH-a-Assay.

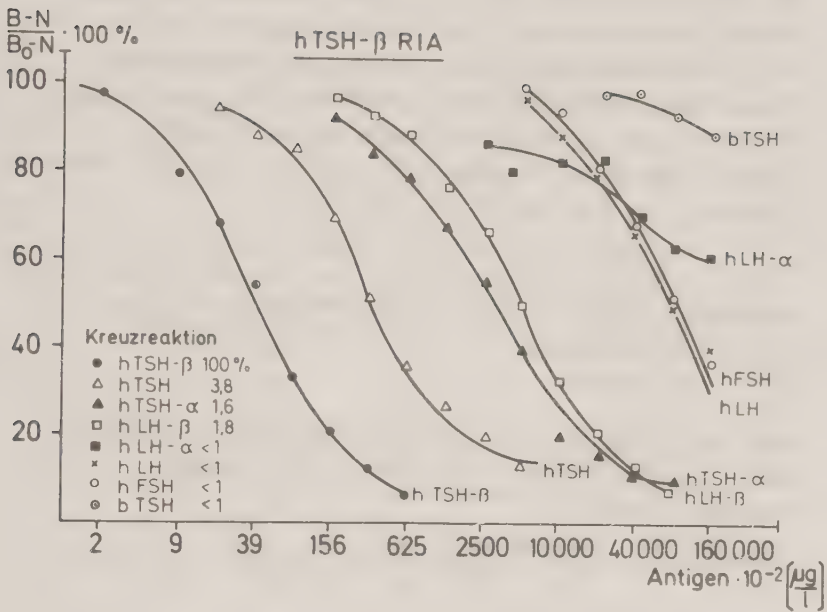


Abb. 26: Vergleich der hTSH- β Standardkurve mit Verdrängungsreaktionen durch bTSH, hTSH, hTSH- α , hLH, hLH- α , hLH- β , hFSH im heterologen hTSH- β -Assay.

Hohe Kreuzreaktionen wurden erwartungsgemäß im hTSH-a-Assay aufgrund der biologischen und immunologischen Ähnlichkeiten der alpha-Einheit der Glykoproteide erzielt.

Im hTSH- β -Ansatz zeigte hTSH mit 3,8 % höchste Kreuzreagibilität. 1 ng der Referenzpräparation von hTSH MRC 68/38 entspricht 3,5 μ U. 1 μ U TSH kann damit im β -Assay lediglich mit 11 pg/ml zum Ergebnis beitragen. Werden bei einer Normalperson Hormonkonzentrationen von 1 μ U/ml TSH und 75 pg/ml hTSH- β gemessen, so beträgt der Anteil der freien Kette 64 pg/ml. 1 μ U/ml hTSH kann die Messungen also nur zu 15 % beeinflussen.

9. ANGEWANDTE METHODIK DER RADIOIMMUNOASSAYS FÜR hTSH-a UND hTSH- β

Nach den Optimierungs- und Spezifitätsuntersuchungen ergaben sich für die hTSH-a und - β Bestimmungen folgende Schemen:

Alle Meßwerte und N wurden 3-fach angesetzt, B_0 6-fach.

<u>a-hTSH</u>		<u>β-hTSH</u>	
1. Tag	100 µl 1 % BSA-Puffer		
	100 µl 5 % BSA-Puffer oder 100 µl Kälberserum		
	100 µl Standard oder Patientenserum		
	100 µl Ak I	1 : 2.000	
48 Stunden Vorinkubation bei Raumtemperatur			
3. Tag	50 µl Tracer mit stab Kaninchen-serum 1 : 200		
	50 µl Puffer 1 % BSA ohne EDTA		
24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur			
4. Tag	100 µl Ak II	100 µl Ak II	
	1 : 15	1 : 10	
4 Stunden Inkubation bei 4° C			
30 Min. Zentrifugation bei 3.000 U/Min			
Dekantieren, Auswischen			
Zählzeit je Probe 2 Min.			

Tab. 3 zeigt Pipettier- und Inkubationsschema für Standardkurven.

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Verdünnungen mit RIA-Puffer II mit EDTA hergestellt.

Unter optimalen Reaktionsbedingungen lagen die rechnerisch ermittelten unteren Nachweisgrenzen (s. 10) für hTSH-a bei 50 pg/ml für hTSH-B bei 20 pg/ml.

10. RECHNERISCHE AUSWERTUNG DER RADIOIMMUNOASSAYS

Alle Rechenoperationen während der Entwicklung der RIAs für hTSH-a und -B wurden an einem Kleinrechner Typ Diehl Alphathronic vorgenommen.

Grundlage der Auswertung eines RIA ist die Standardkurve, die sich bei semilogarithmischer Auftragung (logarithmische Abszisse, lineare Ordinate) sigmoidförmig darstellt. Als für die Berechnung wichtige Daten müssen bei der Standardkurve erfaßt sein:

B_0 = arithmetischer Mittelwert der Zählrate des Standardleerwertes,

B = arithmetischer Mittelwert der Zählrate der Standardprobe,

N = arithmetischer Mittelwert der Zählrate der unspezifischen Bindung.

Für einen bestimmten Standardwert X ergibt sich ein Ordinatenwert in $\left[\frac{\%}{\%} \right] = \frac{B_x - N}{B_0 - N} \times 100$

Umgekehrt kann man für einen unbekannten Probenwert aus der gemessenen Zählrate ($\hat{=}$ Ordinate) auf den zugehörigen Abszissenwert ($\hat{=}$ Gehalt des Serums an gesuchtem Hormon) schließen (17).

Um die Messungen im Patientenserum objektivierbaren Kriterien zu unterwerfen, erfolgte die Auswertung der großen Probendurchläufe mittels Spline-Funktion nach modifiziertem Computerprogramm (21, 22) am Rechner der Fa. Siemens 4004/151 über Lochstreifen aus dem Gamma-Counter.

Das Programm gibt abgesehen vom Mittelwert $\bar{x}$, der Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$ und dem Variationskoeffizienten v der Dreifachbestimmungen der Einzelwertgruppen folgende Informationen aus:

1. Die untere Nachweisgrenze ergibt sich definitionsgemäß aus der dreifachen Standardabweichung von B_0 .
2. Der 50 % Intercept ist diejenige Hormonmenge, die die Hälfte des markierten Antigens verdrängt. Der sinnvolle Meßbereich liegt zwischen 10 und 90 % relativer Bindung mit dem 50 % Intercept als Mittelpunkt.
3. Der Glättungsfaktor wird durch Wichtung, Meßgenauigkeit und formalen Kurvenverlauf mitbestimmt. Die Kurvenplots folgen nicht mehr den Mittelwerten, sondern je nach Glättungsfaktor korrigierten Punkten, die allerdings bei kleinem Faktor den Meßmittelpunkten sehr nahe kommen. Sinnvoll verwertbar ist der Glättungsfaktor bis 5,0. Er kann damit auch direkt als Qualitätsparameter herangezogen werden.
4. Die Summe der Abweichungsquadrate der Spline-Funktion. Verwertbar sind Werte bis zu 2 - 3.
5. Differenzen der approximierten Ordinaten zu den gemessenen Mittelwerten in Absolutbeträgen als Maß für die Rückinterpolierbarkeit. Heuristische Werte liegen zwischen 1 und 2.

6. Die Steigung (slope) einer Geraden, die dann aus der Sigmakurve entsteht, wenn man die Ordinatenwerte einer Logittransformation unterzieht und gegen die logarithmierten Abszissenwerte aufträgt. Durch den Slope können die Assaygeraden unmittelbar auf Parallelität überprüft werden.
7. Regression und Korrelation für die Wiederfindekurve, die bei jeder Patientenmessung parallel zur Pufferstandardkurve angesetzt wurde.
8. An der Spline-Funktion werden rechnerisch der Probengehalt der Patientenseren und der entsprechende Vertrauensbereich durch lineare Interpolation mit der Regula Falsi bestimmt.

B_0 , N, untere Nachweisgrenze, 50 % Intercept, Glättungsfaktor, normierte Abweichung, Slope, Regression und korrelationskoeffizient können direkt zur Qualitätskontrolle der Assays herangezogen werden.

Variationskoeffizienten innerhalb der Serie und von Tag zu Tag wurden durch ein Programm am Tischrechner errechnet, wobei

$$\text{Intraassay-VK} = \frac{\text{gemittelttes S aller Werte}}{\text{gesamt } \bar{x}} \times 100 \% \text{ und}$$

$$\text{Intraassay-VK} = \sqrt{\frac{S_1^2 + \dots + S_n^2}{\text{Zahl der Assays} \times \text{Vielfachheit}}} \times 100 \% \text{ ist.}$$

Abb. 27 zeigt Kurvenplots nach Spline für hTSH- β .

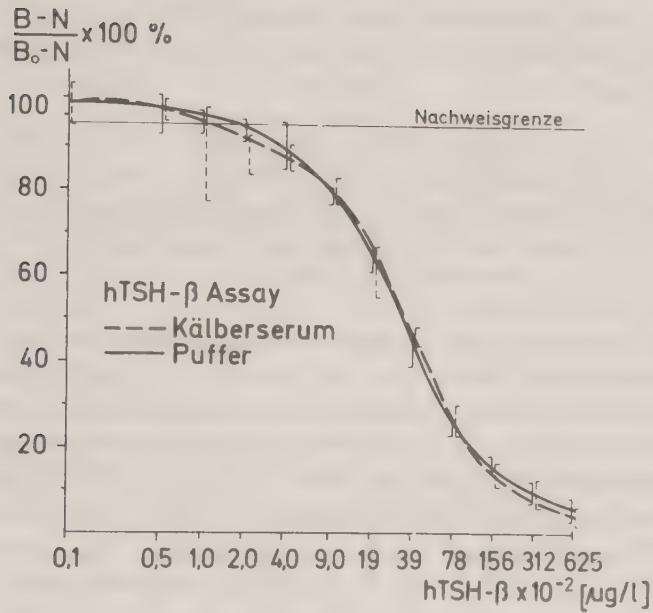


Abb. 27: Darstellung zweier nach Spline geplotteter Kurven für hTSH-β in Puffer und antigen-freiem Serum (=Wiederfinderserum).

11. QUALITÄTSKONTROLLE

11.1 Präzision (23)

Als Parameter zur fortlaufenden Kontrolle der Stabilität der Assays zogen wir Slope, mittlere Abweichung, 50 % Intercept, mittlere spezifische Bindung, Glättungsfaktor, Regression und Korrelation zwischen Serum- und Pufferkurve heran (s.10.).

Das gesamte Patientengut konnte in jeweils 4 Assays für hTSH-a und hTSH- β gemessen werden. Zur Auswertung der Patientenproben wurden nur solche Einzelwertgruppen herangezogen, bei denen der Variationskoeffizient unter 10 % lag.

Neben den Standardkurven wurden bei allen Meßreihen an drei verschiedenen Positionen der Probenkette jeweils eine Dreifachbestimmung eines Kontrollserums durchgeführt. Dazu dienten die Seren eines Patienten mit hohem und eines mit niedrigem Gesamt-TSH. Aus den Daten Mittelwert, Variationskoeffizient und Vielfachheit des Assays ließen sich der Intraassayvariationskoeffizient als Abweichung eines Wertes innerhalb des Assays und der Interassayvariationskoeffizient als Abweichung zwischen den Assays bestimmen.

Tab. 4 Intraassayvariationskoeffizient:

hTSH-a			hTSH-B	
TSH hoch:	4,66	6 Daten	7,73	9 Daten
	4,11	6 Daten	13,66	6 Daten
	4,71	6 Daten	8,26	6 Daten
	13,8	6 Daten	5,46	8 Daten
TSH niedrig:	4,3	9 Daten	4,47	9 Daten
	4,77	6 Daten	3,16	6 Daten
	5,70	6 Daten	2,52	6 Daten
	13,12	6 Daten	4,44	6 Daten

Tab. 4 zeigt die Intraassayvariationskoeffizienten für hTSH-a und -B gemessen an Seren mit hohem und mit niedrigem Gehalt an Gesamt-TSH.

Tab. 5 Interassayvariationskoeffizient:

hTSH-a		hTSH-B	
TSH hoch	3,24	3,37	
	bei 4 Assays,	bei 4 Assays,	
	6 Vielfachheiten	6 Vielfachheiten	
TSH niedrig	2,98	1,27	
	bei 4 Assays,	bei 4 Assays,	
	6 Vielfachheiten	6 Vielfachheiten	

Tab. 5 zeigt die Interassayvariationskoeffizienten für hTSH-a und -B bestimmt an Seren mit hoher und niedriger TSH-Konzentration.

Die zur Bewertung herangezogenen Qualitätsparameter zeigten eine gute Stabilität der Assays an. Alle Standardkurven wurden mit dem kleinstmöglichen Glättungsfaktor 0,2 ausgedruckt, sodaß der Kurvenverlauf trotz Spline-Optimierung eng den tatsächlich bestimmten Meßpunkten folgte.

Regression (für hTSH-a: 0,996 / 0,787 / 1,025;
 für hTSH-β: 0,890 / 1,029 / 0,850)
 und

Korrelation (für hTSH-a: 1,000 / 0,998 / 0,997;
 für hTSH-β: 0,997 / 0,999 / 1,000)

zwischen Puffer- und Wiederfindestandardkurve ergaben sehr gute Übereinstimmung und zeigten annähernde Immunoidentität. Die Reproduzierbarkeit der Assays war durch zum Teil sehr niedrige Inter- und Intraassayvariationskoeffizienten sichergestellt.

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Assays wurde durch einen Parallelitäts- und Wiederfindetest (17, 23) untersucht.

Die Prüfung der Parallelität im Assay wird folgendermaßen durchgeführt: Im Assay wird der Hormongehalt einer 100 ul Patientenprobe bestimmt. Setzt man den x-fachen Teil des Serums ein, darf man nur den x-fachen entsprechenden Hormongehalt messen.

Abb. 28 zeigt den Parallelitätstest für hTSH-a und Abb. 29 hTSH-β.

Die Gerade verläuft im beta-Assay flacher als die rechnerisch erwartete Steigung beträgt. Im verdünnten Serum würden bis zu 10 % zu niedrige Werte gemessen werden; im alpha-Assay durch größere Steilheit bis zu 12 % zu hohe Werte.

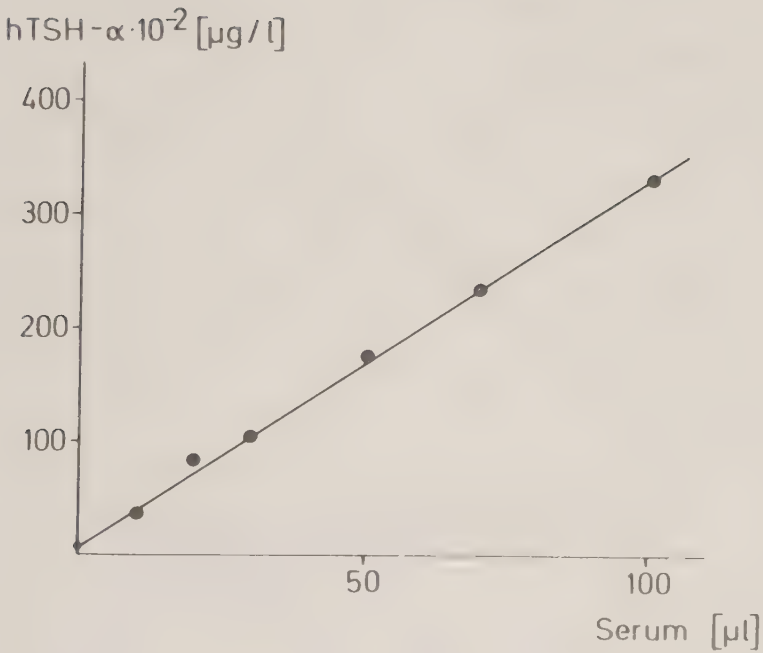


Abb. 28: Prüfung der Parallelität von Serummessungen im hTSH-a Assay in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen eines Serums

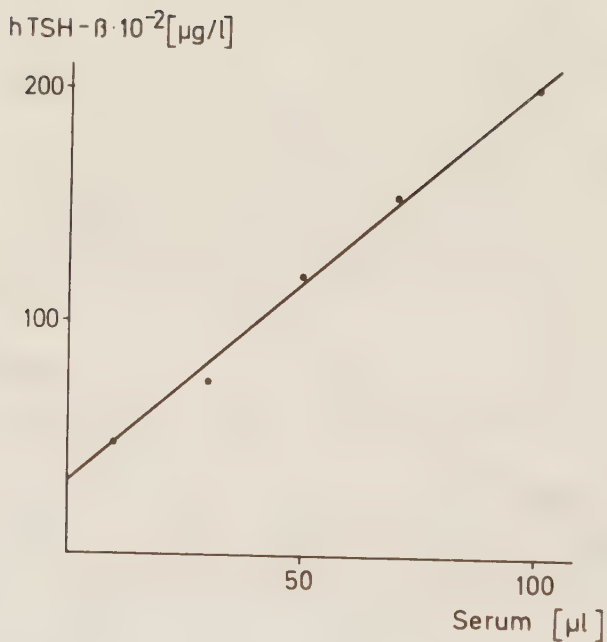


Abb. 29: Prüfung der Parallelität von Serummessungen im hTSH- β Assay in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen eines Serum

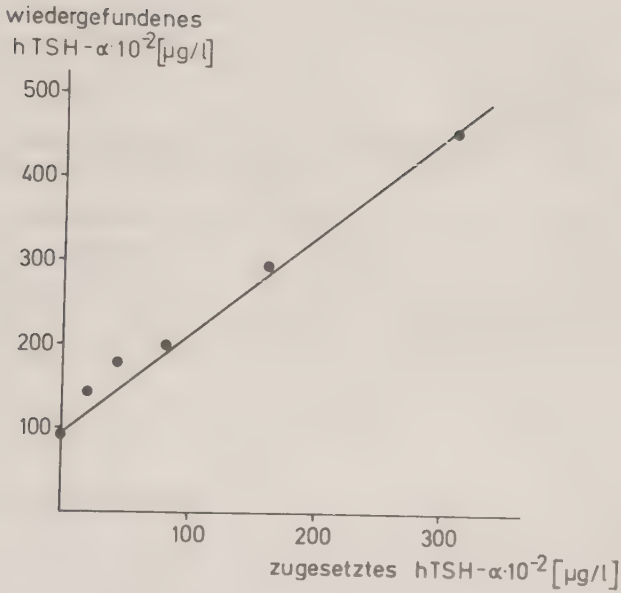


Abb. 30: Wiederfindequalität des hTSH-α Assays in Abhängigkeit von steigenden Standardmengen, die einem Patientenplasma zugesetzt werden.

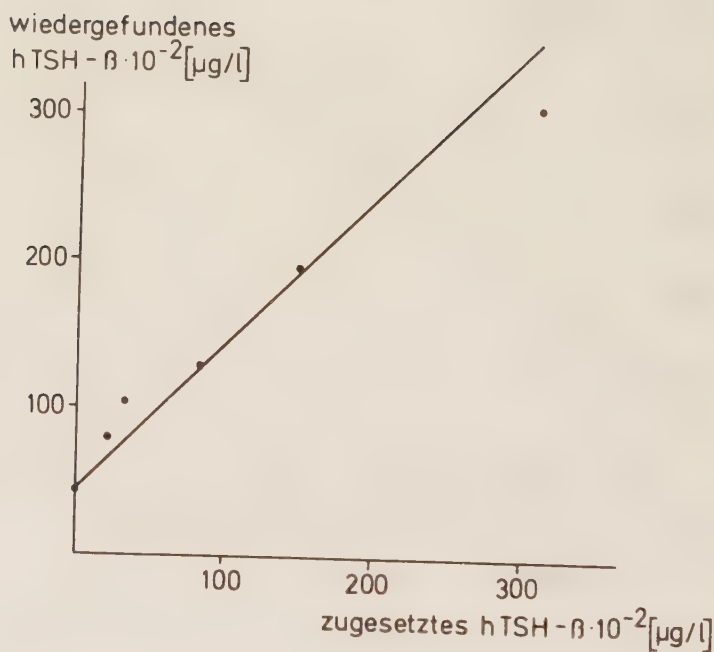


Abb. 31: Wiederfindequalitäten des hTSH-β Assays in Abhängigkeit von steigenden Standardmengen, die einem Patientenplasma zugesetzt werden.

Beim Wiederfindetest dagegen wird dem Patientenserum eine bestimmte Standardmenge des Hormons zugesetzt und der Gesamtgehalt dann im RIA bestimmt.

Bei linearer Auftragung der Meßergebnisse müßte sich eine Gerade mit 45^0 Steigung ergeben.

Beide Assays erfüllen diese "Recovery"-Bedingungen, wie Abb. 30 für hTSH-a und Abb. 31 für hTSH-B zeigen.

12. KLINISCHE ANWENDUNG DER UNTEREINHEITEN ASSAYS

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin, anhand von hochempfindlichen RIAs für TSH-Untereinheiten der Frage nachzugehen, ob bei Schilddrüsenerkrankungen und insbesondere bei der endokrinen Ophthalmopathie inadäquate Sekretionsraten von hTSH-a und hTSH- β nachweisbar sind.

12.1 Patientenkollektive

Die zu untersuchenden Patientenseren stammten alle aus klinisch indizierten TRH-Tests. Nach Blutentnahme für den basalen TSH-Wert erhielt der Proband 0,2 mg eines synthetischen TRH-Präparates (Relefact Höchst) intravenös. Nach genau 30 Minuten wurde der stimulierte TSH-Wert abgenommen.

Für die Bestimmung der hTSH-a Einheit standen uns 111 Patientenproben zur Verfügung. Im Hinblick auf die Unspezifität dieser Untereinheit wurde das Patientengut folgendermaßen eingeteilt:

- Frauen in der Prämenopause	47 Fälle
- Frauen in der Postmenopause (ab dem 50. Lebensjahr)	39 Fälle
- Männer	25 Fälle.

Innerhalb dieser Gruppen wurden hinsichtlich der Diagnose lediglich Schilddrüsenerkrankungen in der weiteren Einteilung berücksichtigt.

Für hTSH- β standen uns 138 Patientenproben zur Verfügung. Sie wurden nach klinischen Diagnosen und Hormonwerten in 9 Gruppen eingeteilt.

Als Laborparameter zogen wir heran:

T₃ (RIA der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig
Normbereich: 0,7 - 1,9 ng/ml, VK 12,8 %)

T₄ (RIA der Fa. Amersham-Buchler,
Normbereich 4,7 - 14,2 μ g/100 μ l, VK: 7,7 %)

TSH (RIA der Fa. Henning, Berlin,
Normbereich 0,78 - 4,0 μ U/ml, VK: 13,3 % basal)
und nach 0,2 mg TRH (Relefact der Fa. Hoechst,
Frankfurt)

TBI (Kit der Fa. Amersham-Buchler,
Normbereich 0,92 - 1,17, VK 13 %)

Die Hormonwerte wurden von PD Dr. Vogt, Institut für klinische Chemie, Klinikum Großhadern bestimmt.

1. Das Normalkollektiv = schilddrüsengesund 22 Fälle
2. Sekundär euthyreote Patienten = schild-
drüsenkrank, unter Therapie jetzt euthyreot,
evt. TRH supprimiert, oder in der Anamnese
Hyperthyreose bekannt 11 Fälle

3. Primär euthyreote Patienten bei szintigraphisch gesicherten Veränderungen der Schilddrüse, Labordaten normal 47 Fälle
4. Hyperthyreose-Patienten 14 Fälle
5. "Subklinische" Hyperthyreose-Patienten = TRH supprimiert, periphere Hormone aber grenzwertig oder normal 12 Fälle
6. "Subklinische" Hypothyreose-Patienten = T_3 , T_4 normal oder grenzwertig, TSH basal normal oder leicht erhöht, nach TRH starker Anstieg, mehr als fünffach 12 Fälle
7. Patienten mit autonomen Adenom (szintigraphisch diagnostiziert)
dekompensiert 4 Fälle
kompensiert 4 Fälle
8. Patienten mit Hypophysentumoren unterschiedlicher Histologie
praeoperativ 10 Fälle
postoperativ 10 Fälle
9. Patienten mit endokrinem Exophthalmus klinisch diagnostiziert, nach den Hormonwerten in die Gruppe 2 - 6 gehörend 24 Fälle

12.2 Methode

0,1 ml Patientenserum wurde nach den entsprechenden Inkubationsbedingungen für den Assay (s. 9.) analog dem bekannten Standard mit 1. Antikörper vorinkubiert.

Alle übrigen Reagenzien der Assays wurden in Mengen und Verdünnungen eingesetzt, wie sie sich für Standardbedingungen optimal erwiesen haben.

12.3 Ergebnisse

Für die Auswertung der Messungen wurde die statistische Verteilung im logarithmischen Verteilungsnetz überprüft (24). In Analogie zu einer Vielzahl biologischer Größen ergab sich für hTSH-Untereinheiten eine logarithmische Normalverteilung.

Als charakteristische Zahlenwerte sind deshalb 5 % Perzentile - lg-Mittelwert - 95 % Perzentile angegeben.

Tab. 6 zeigt die basalen Werte vor und die stimulierten Werte nach 30 Minuten nach TRH für hTSH-a.

Der Basalwert für hTSH-a lag bei Männern (N = 25) und Frauen (N = 47) in der Prämenopause bei 642 pg/ml, bei Frauen in der Postmenopause (N = 39) bei 1.835 pg/ml. Nach TRH stieg er bei Männern und Frauen in der Prämenopause auf 1.498 pg/ml und bei Frauen in der Postmenopause auf 2.749 pg/ml an.

Vergleichend sind die Ergebnisse für hTSH- β in Abb. 32 und Tab. 7 nach Diagnosen aufgeschlüsselt angegeben. Bei den 0' - und 30' - Werten sind aufgeführt:

5 % Perzentile - lg-Mittelwert - 95 % Perzentile

hTSH-a	Frauen in der Postmenopause (N=39)	Frauen in der Prämenopause (N=47)	Männer (N=25)
0'	1393 - <u>2034</u> - 2969	206 - <u>466</u> - 1053	423 - <u>626</u> - 927
30' nach TRH	N=22: nicht stimulierbar ($\pm$ 59 %) N=8: Abfall auf das 0,7-fache ($\pm$ 20 %) N=9: stimuliert um das 2,2-fache ($\pm$ 21 %)	N=27: nicht stimulierbar ($\pm$ 58 %) N=2: Abfall ($\pm$ 4 %) N=16: stimuliert um das 3,1-fache ($\pm$ 34 %) N=3: Waren nach TRH über der oberen Nachweisgrenze	N=12: nicht stimulierbar ($\pm$ 48 %) N=2: Abfall ($\pm$ 8 %) N=11: stimuliert auf das 2,6-fache ($\pm$ 44 %)

Tab. 6: Basale und stimulierte Werte (30' nach TRH) von hTSH-a

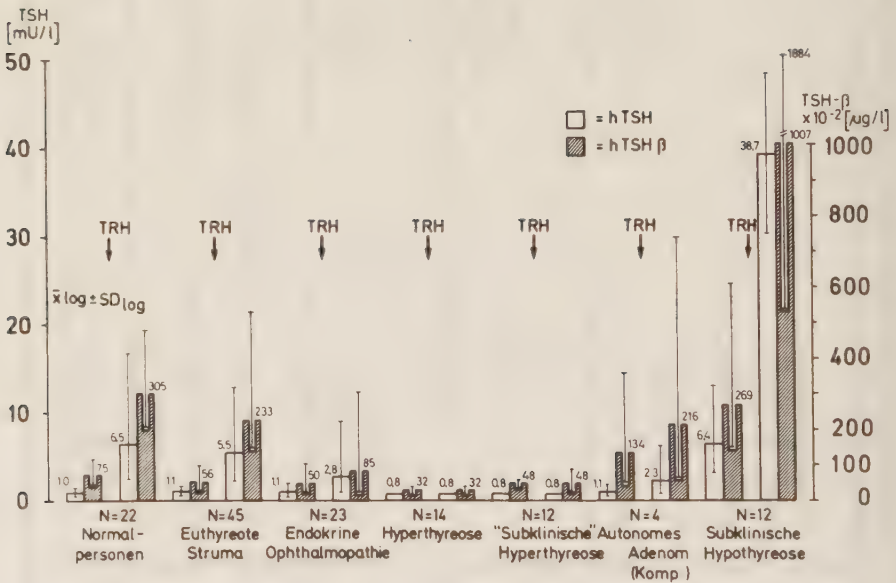


Abb. 32: Übersicht über logarithmische Mittelwerte und Standardabweichungen von hTSH und hTSH-β vor und 30 Minuten nach Stimulation durch TRH an 7 ausgewählten Patientenkollektiven.

Gruppe	N	0' hTSH- β pg/ml	30' hTSH- β pg/ml	Anstieg %	0' TSH pU/ml	30' TSH pU/ml	Anstieg %	$\bar{x}$ T ₃ ng/ml	$\bar{x}$ T ₄ ng/ml
Normalpersonen	22	47-75-119	212-305-486	306	0,97	6,50	570	1,5	8,5
sekundäre Euthyreose	11	30-55-100	72-168-390	205	3,90	8,20	110	1,6	7,5
primäre Euthyreose	47	33-58-102	102-233-334	308	1,11	5,45	390	1,9	9,2
hyperthyreose	14	22-32-48	22-32-45	0	0,8	0,8	0	4,1	18,5
subklinische hyperthyreose	12	41-48-56	26-48-87	0	0,8	0,8	0	1,6	9,88
subklinische Hypothyreose	12	146-269-495	488-972-1934	274	6,44	39,66	504	1,5	8,5
kompensiertes Adenom	4	49-134-364	63-216-742	61	1,09	2,28	109	1,5	9,88
endokrine Ophthalmopathie	23	23-50-106	23-85-509	71	1,07	2,81	162	2,6	9,90
Hypophysentumor präoperativ	10	15-49-153	45-143-443	191	1,40	5,50	292	1,4	7,1
Hypophysentumor postoperativ	10	29-50-87	25-106-145	112	1,50	6,5	320	1,5	7,5

Tab. 7: Log. Mittelwerte aller gemessenen Schilddrüsenparameter und der hTSH- β -Untereinheiten vor und nach Stimulation durch TRH

Bei der Patientengruppe mit dekompensiertem autonomen Adenom lagen nur 2 Fälle innerhalb des Meßbereichs des Assay. Dieses Kollektiv wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt.

12.4 Klinische Wertung

Männer und Frauen vor der Menopause zeigten eine annähernd gleiche Serumkonzentration an hTSH- α , während bei Frauen nach der Menopause die Konzentration etwa 4,5 mal höher ist.

In der Hälfte der 111 untersuchten Fälle ($N = 61$) war durch TRH keine Stimulation der Untereinheitensekretion zu erzielen.

Zwischen Stimulierbarkeit und Nichtstimulierbarkeit und klinischen Diagnosen ließ sich nur im Fall der subklinischen Hypothyreose ein Zusammenhang herstellen. Alle 8 Fälle zeigten hohe basale Serumkonzentrationen und waren im Mittel um 192 % stimulierbar.

Für hTSH- β lagen die mittleren Basalwerte der euthyreoten Gruppen (Normal, primär und sekundär euthyreot) ($N = 70$) zwischen 55 und 75 pg/ml. Die 30'-Werte zeigten Steigerungen auf 168 bis 305 pg/ml und folgten damit einer mit Gesamt-TSH vergleichbaren Stimulation.

Ebenso war bei Hyperthyreosen (einschließlich subklinisch) ($N = 26$) keine Stimulation auf TRH weder bei hTSH- β noch bei TSH zu verzeichnen. Der Basalwert von 38 - 42 pg/ml lag niedriger als der 0'-Wert der Euthyreoten.

Die subklinischen Hypothyreosen (N = 12) zeigten deutlich höhere Basalwerte mit 269 pg/ml, die sich nach TRH auf 972 pg/ml erhöhten. Die prozentuale Steigerung lag mit 274 % im Bereich der Stimulation der Euthyreoten. Von 12 Fällen zeigten 5 einen bereits erhöhten hTSH- β Basalgehalt bei noch normalem hTSH Basalgehalt.

Beim kompensierten autonomen Adenom zeigte sich bei normalem hTSH-Basalwert erhöhte hTSH- β -Spiegel: 134 pg/ml. Der O'-Wert lag damit doppelt so hoch wie bei den Normalen und stieg auf nur 216 pg/ml nach TSH an. Da das Kollektiv aber nur aus 4 Patienten bestand, sind keine verbindlichen Aussagen zu treffen.

Die Gruppe der Patienten mit endokriner Ophthalmopathie und die mit Hypophysentumoren sind sehr inhomogene kollektive. Mittelwerte der Gruppen lassen sich daher nur mit Vorbehalt angeben. Der Basalwert bei der Exophthalmusgruppe lag mit 50 pg/ml im Bereich der Euthyreosegruppen und nach Stimulation bei 85 pg/ml, eine Steigerung etwa im Bereich der Adenomkranken.

Entsprechendes gilt auch für die Hypophysentumoren. Bei Patienten vor Operation ließen sich die Basalwerte um 191 % von 49 auf 143 pg/ml steigern, postoperativ um 112 % von 50 auf 106 pg/ml. Auch hier ist es nicht die klinische Diagnose, sondern die Konzentration an Gesamt-TSH, die über den Gehalt an hTSH- β entscheidet.

Um Beziehungen zu den übrigen Schilddrüsenparametern aufzudecken, wurden bei allen Gruppen die in Tabelle 8 dargestellten Korrelationen geprüft, und Regressionsanalysen durchgeführt.

Abb. 33, 34, 35, 36 zeigen ausgewählte Korrelationen in graphischen Darstellungen für die Patientengruppe der primären Euthyreose.

In allen Gruppen fanden sich gute Korrelationen für hTSH- β und hTSH basal, delta hTSH- β und delta hTSH und hTSH- β und hTSH stimuliert.

13. DISKUSSION DER KLINISCHEN ERGEBNISSE

In Arbeiten von Kohn und Winand (25) wurde erstmals die Möglichkeit diskutiert, daß hTSH-Fragmente oder -Untereinheiten an der Entstehung der endokrinen Ophthalmopathie beteiligt sein könnten. Aber hTSH- β Radioimmunoassays waren bisher nicht ausreichend empfindlich, um Bestimmungen bei anderen Krankheitsgruppen als den hypothyreoten Patienten durchführen zu können.

Die im Blut zirkulierenden hTSH-Untereinheiten sind wahrscheinlich keine Spaltprodukte des Gesamthormons, sondern werden unter hypothalamischer Regulation aus dem Hypophysenvorderlappen sezerniert (1, 2, 26, 27). Als Hinweis für die eigenständige Sekretion wurde gewertet, daß der TRH bedingte Sekretionsgipfel von hTSH- β und hTSH zeitlich nicht exakt zusammenfällt (2, 27, 28, 29), und daß der Anstieg der β -Einheit prozentual wesentlich höher ausfällt als der von Gesamt-TSH (27, 28).

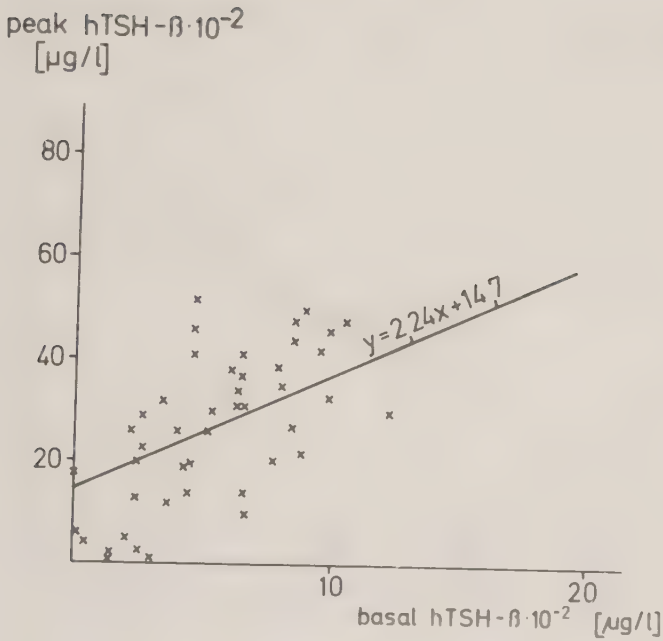


Abb. 33: Punktwolke und Korrelationsgerade zwischen basalem hTSH- β und peak hTSH- β .

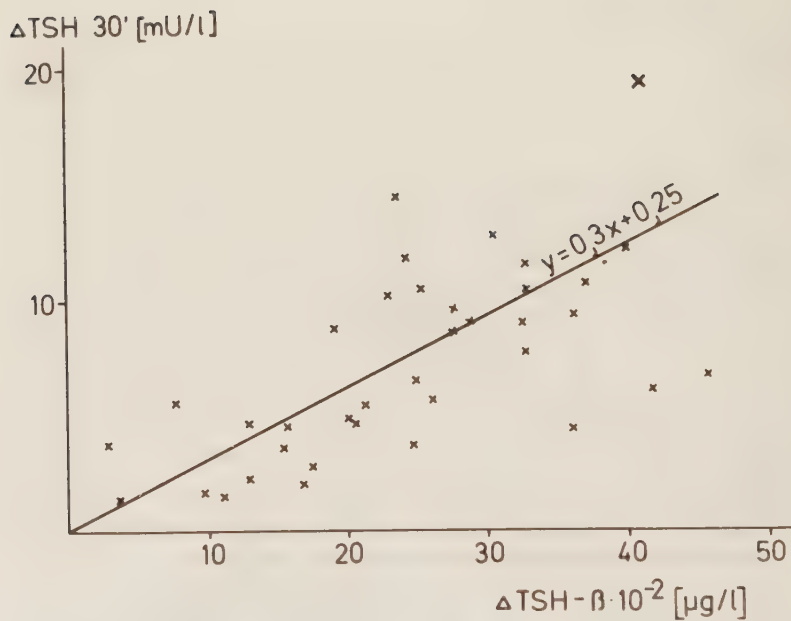


Abb. 34: Punktwolke und Korrelationsgerade von delta TSH- β gegen delta TSH

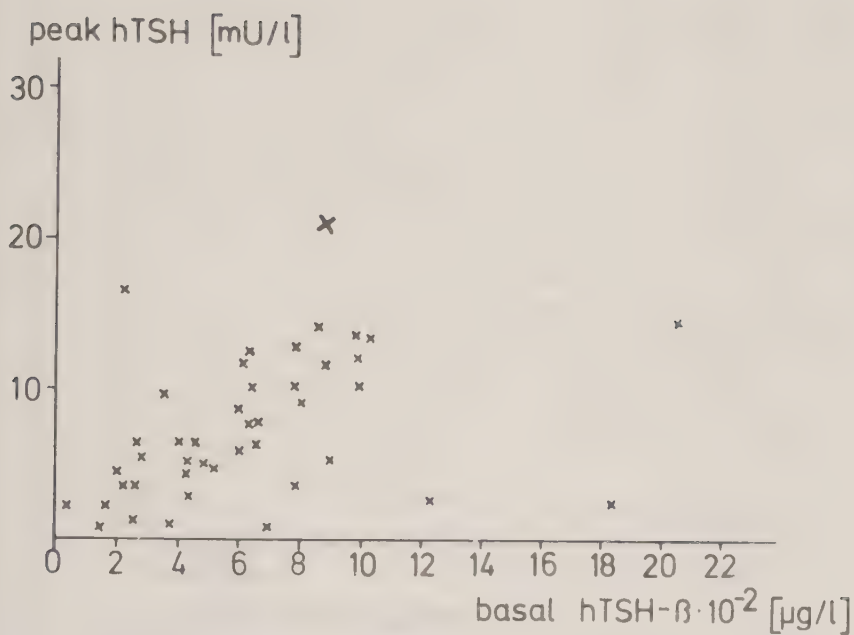


Abb. 35: Graphische Darstellung der Korrelation von basalem hTSH-β gegen peak hTSH.

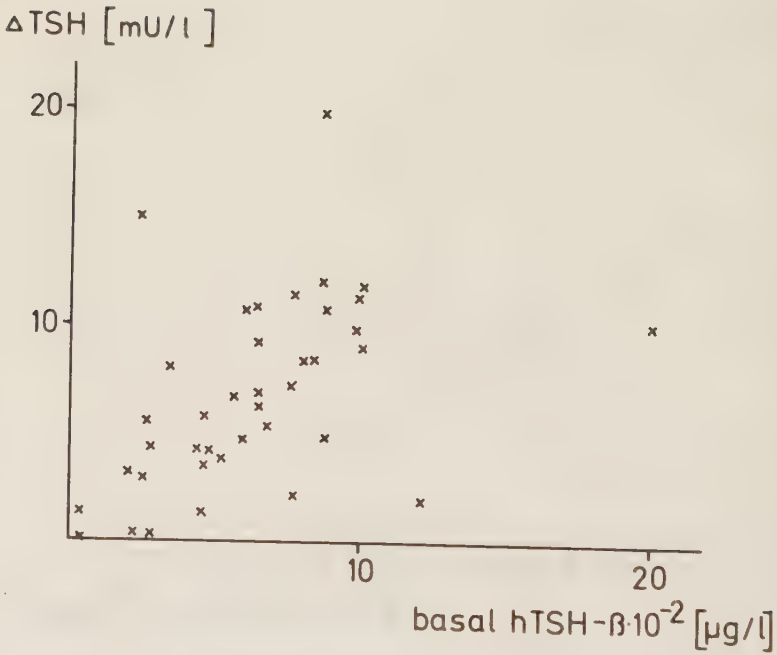


Abb. 36: Graphische Darstellung der Korrelation von basalem hTSH-β gegen delta TSH.

	N	basal/peak TSH/TSH	basal/peak TSH-β/TSH-β	delta/delta TSH/TSH-β	peak/peak TSH/TSH-β	basal/peak TSH/TSH-β	basal/basal TSH/TSH-β
Normal	20	n.s.	= 0,54 p = 0,01	= 0,66 p = 0,01	= 0,56 p = 0,05	n.s.	n.s.
primär euthyreot	46	r = 0,46 p = 0,01	= 0,59 p = 0,01	= 0,62 p = 0,01	= 0,78 p = 0,01	n.s.	n.s.
sekundär euthyreot	11	r = 0,89 p = 0,001	= 0,70 p = 0,05	n.s.	= 0,60 p = 0,05	n.s.	n.s.
endokrine ophthalmopathie	17	= 0,87 p = 0,001	= 0,79 p = 0,01	= 0,93 p = 0,01	= 0,95 p = 0,001	n.s.	n.s.
Hyperthyreose	11	= 0,88 p = 0,001	= 0,96 p = 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
subklinische Hyperthyreose	12	= 0,99 p = 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
subklinische Hypothyreose	11	= 0,70 p = 0,05	= 0,66 p = 0,05	n.s.	= 0,62 p = 0,05	= 0,85 p = 0,001	= 0,60 p = 0,05

n.s. = nicht signifikant r = korrelationskoeffizient p = Signifikanzbereich

Tab. 8 zeigt Korrelationen der untersuchten Parameter bei Schilddrüsenfunktionsstörungen

Im hTSH-a RIA ergaben sich für Frauen nach der Menopause 4,5 mal höhere Konzentrationen wie für Frauen vor der Menopause und für Männer. Die hohen Kreuzreaktionen mit hLH und hLH-a erlauben aber keine eindeutige Zuordnung der Meßwerte zu hTSH-a, sondern definieren die Konzentration als a-ähnliche Immunoreaktivität, da die erhöhten Blutspiegel der Probandinnen in der Postmenopause durch Sekretion aus gonadotropen Hypophysenzellen unterhalten werden (1, 30).

In Arbeiten von Kourides et al. wurde gezeigt, daß für die a-Einheit, die allen Glykoproteidhormonen (LH, FSH, TSH, HCG) gemeinsam ist, mindestens zwei unterschiedliche Pools existieren, die auf ihre spezifischen Stimulatoren TRH und LHRH reagieren (30).

Bei 55 % (N = 61) unseres Gesamtkollektivs (N = 111) fehlte ein Anstieg der Untereinheit auf TRH (1, 31). 33 % der Probanden (N = 36) waren stimulierbar. Nach diesen Zahlenwerten ist keine verbindliche Aussage möglich, ob die vorhandene oder fehlende Stimulierbarkeit den Normalfall darstellt und auch die einschlägige Literatur läßt keine Entscheidung darüber zu (1, 30, 32).

Bei Patienten mit subklinischer Hypothyreose zeigten die gemessenen hTSH-a Werte konkordantes Verhalten zu den Gesamthormonwerten vor und nach Stimulation (1).

Kourides et al. konnte zeigen, daß hierfür vor allem eine gesteigerte Sekretion der a-Einheit aus der Hypophyse verantwortlich ist, obgleich zusätzlich eine verlangsamte Metabolisierungsrate erwiesen zu sein scheint (28, 32).

Unsere errechneten Mittelwerte der 3 Gruppen: Frauen in der Prämenopause, in der Postmenopause und Männer zeigten sehr große Variationsbreiten. Die Inhomogenität der Kollektive, die nur nach Geschlecht und Alter (ab 50. Lebensjahr Postmenopause) unterteilt wurden, könnten eine Erklärung dafür bringen. Tatsächlich sind nämlich in der Literatur erhöhte a-Spiegel bei Niereninsuffizienz durch verlangsamte Metabolisierung (28, 32, 34), bei Brustkrebs (35, 36) und bei Hypophysenadenomen (33, 37) beschrieben worden, dagegen senken T_4 (10) und wahrscheinlich auch Glukokortikosteroide (38) die Serumspiegel an a-Einheit. In unserem Patientengut waren 2 an Niereninsuffizienz, 1 an Brustkrebs, 10 an Hypophysenadenomen erkrankt, 40 wurden mit T_4 und 14 mit Glukokortikoiden therapiert.

Eine weitere Unterteilung der Gruppen, die die oben angeführten Gesichtspunkte berücksichtigt, erschien uns aber wegen der vorläufig noch geringen Fallzahlen nicht sinnvoll.

Zur Untersuchung der B-Einheit wurden die Patienten nach klinischen Diagnosen in 9 Gruppen unterteilt: Normalkollektiv, Patienten mit primärer und sekundärer Euthyreose, mit Hyperthyreose mit kompensiertem und dekompenziertem autonomen Schilddrüsenadenom, mit Hypophysentumoren (prä- und postoperativ) und 2 kollektive mit subklinischen Veränderungen, d.h. bei normalen peripheren Schilddrüsenhormonen ist TSH übernormal hoch oder mit TRH nicht stimulierbar.

Als Sondergruppe ergab sich zusätzlich entsprechend der Klassifikation der American -Thyroid- Association (39) nach Exophthalmometrie und Ultrasonographie ein Kollektiv

mit endokriner Ophthalmopathie (40). Nach den Hormonwerten waren 11 hyperthyreot, 6 euthyreot, 1 subklinisch hypothyreot, und 5 euthyreot aber mit supprimiertem TSH. Keiner unserer Exophthalmuskranken war entgegen Untersuchungen von Chopra durch TRH übernormal hoch mit TSH stimulierbar (41).

β -TSH Spiegel waren bisher nur im hypothyreoten Serum bestimmbar (2), was den um ein Vielfaches geringeren Gehalt der Hypophyse an freiem hTSH- β verglichen mit der α -Einheit verdeutlicht (42). Hier wurde ein Assay entwickelt mit einer unteren Nachweisgrenze von 20 pg/ml, der β -Einheiten auch im Serum von Patienten mit supprimiertem TSH meßbar macht.

Lediglich bei 3 Hyperthyreose-Kranken fand man Serumkonzentrationen unterhalb dieses Grenzwertes; das bedeutet auf ihr eigenes Kollektiv bezogen 21 %, bezogen auf das Gesamtkollektiv: nur 2,2 % lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Von den Hyperthyreosekranken zeigten 11 signifikant niedrige basale hTSH- β Werte und waren entsprechend dem Verhalten von TSH durch TRH nicht stimulierbar.

Übereinstimmende Befunde ergaben sich für TSH und hTSH- β auch bei den Fällen der "subklinisch" Erkrankten.

Bekanntlich ist eine abnorme TSH-Sekretion der erste und empfindlichste Parameter für eine beginnende pathologische Schilddrüsenfunktion (41). Bigos et al. konnte zeigen, daß Entsprechendes auch für die hTSH- α Untereinheit gilt (43). Gleiches gilt aber auch insbesondere für hTSH- β .

Patienten mit "subklinischer" Hyperthyreose zeigten im Vergleich zum Normalkollektiv nur gering erniedrigte basale hTSH- β Werte, fielen aber durch fehlende Stimulierbarkeit sowohl der Untereinheit als auch des Gesamthormons auf. Bei Patienten mit "subklinischer" Hypothyreose fanden wir rund 4 mal höhere basale β -Konzentrationen als beim Normalkollektiv. 5 von 12 Patienten zeigten schon erhöhte basale hTSH- β Werte bei noch normalen basalen TSH-Spiegeln. Deutlicher wurde das Ergebnis dann nach Stimulation. Alle 12 Patienten hatten 30'-Werte, die dreifach höher lagen als die 30'-Werte der Normalpersonen. Die prozentuale Steigerung in beiden Kollektiven blieb aber in etwa gleich: 274 % bei subklinischer Hypothyreose, 306 % beim Normalkollektiv.

Bei Patienten mit kompensiertem autonomen Adenom war die Stimulierbarkeit (61 %) gegenüber den Normalpersonen (306 %) deutlich vermindert, da aber die Steigerung von einem hohen basalen Wert ausging, entsprach der 30'-Wert wieder den euthyreoten Gruppen.

Bei den dekompenzierten Schilddrüsenadenompatienten lagen 2 Serumspiegel von β -TSH unterhalb der Nachweisgrenze. Berechnungen und Vergleiche waren bei insgesamt nur 4 Fällen nicht sinnvoll.

Die prozentuale Steigerung von TSH- β 30' nach TRH war bei Patienten mit präoperativen (191 %) und postoperativen (112 %) Hypophysentumoren ähnlich gering wie bei Patienten mit kompensiertem Schilddrüsenadenom. Der 0'-Wert lag jedoch hier im Normbereich.

Die Beobachtung von Kourides, an der fehlenden Stimulierbarkeit von TSH und dessen Untereinheiten Patienten mit Hypophysentumor zu erkennen, konnten wir nicht nachvoll-

ziehen (44).

In der - bezüglich Schilddrüsenfunktion - inhomogenen Gruppe der Patienten mit endokriner Ophthalmopathie fanden sich weder abnorm hohe basale Spiegel der Unter-einheiten - also kein erhöhtes hTSH- α oder hTSH- β -, noch zeigten unsere Probanden eine überhöhte Stimulation für hTSH oder hTSH- β mit TRH. Die bezüglich Unter-einheit und Gesamthormon supprimierten Patienten zeigten konkordantes Verhalten zu den peripheren Schilddrüsenhormonparametern. Das Kollektiv unserer e0-Patienten war weder im Hinblick auf Gesamt-TSH in die beiden Gruppen - supprimiert oder übernormal stimulierbar - einzuteilen (nach Chopra 41) noch konnten wir analoge Beobachtungen für hTSH- β machen. Je nach Ausgangslage der aktuellen Schilddrüsenfunktion verhielt sich auch die TSH-Unter-einheit.

Wie in fast allen Gruppen korrelierten auch hier basal hTSH- β und basal hTSH mit den Peak-Werten nach TRH.

Es ist also wenig wahrscheinlich, daß die β -Einheit ursächlich an der Entstehung der endokrinen Ophthalmopathie beteiligt ist. Sie zeigt auch keine gesteigerte Ansprechbarkeit auf das spezifische Releasing Hormon. Inwieweit jedoch hochmolekulare hTSH- β Formen, das sogenannte "big hTSH- β " (42) oder biologische und immunologische Unterschiede zwischen Poolformen und zirkulierenden Formen, wie sie für hLH (45) und hTSH (46) gezeigt werden konnten, für die endokrine Ophthalmopathie verantwortlich sein können, wurde durch diese Arbeit nicht untersucht.

In allen untersuchten Gruppen fiel nach 30 Minuten die prozentuale Steigerung durch TRH für hTSH- β niedriger

aus als für hTSH. Nach dieser Zeitspanne erfaßt man wahrscheinlich nicht mehr den Maximalwert, der bereits nach 20 Minuten erreicht werden soll (2). Es bleibt aber auch zu bedenken, daß ein Teil der sezernierten Untereinheiten zur Rekombination zu Gesamthormon verwendet werden könnte (1), oder daß unterschiedliche Pools für akute und chronische Sekretion von TSH und dessen Untereinheiten in der Hypophyse existieren könnten (28).

Erwiesen ist jedoch, daß Funktionsänderungen der Schilddrüse mit aktiver Beteiligung der Sekretionsraten von TSH-Untereinheiten aus dem Hypophysenvorderlappen einhergehen (28, 32). Trotz zusätzlicher Verlangsamung der Metabolisierungsraten bei Hypothyreose z.B. bleibt als ursächliche Änderung die vermehrte oder verminderte Sekretion von hTSH- α und - β als ausschlaggebender Faktor bestehen. Pathologische Blutkonzentrationen sind damit nicht mit veränderten Stoffwechselbedingungen und damit gestörter Metabolisierung zu erklären, sondern sind Ausdruck eines gestörten hypothalamischen Regulationsmechanismus.

14. ZUSAMMENFASSUNG

Hochempfindliche Radioimmunoassays wurden für hTSH-Untereinheiten entwickelt. Die Hormonpräparationen (Fa. Calbiochem) wurden nach einer modifizierten Chloramin-T-Methode mit ^{125}Jod markiert und durch Chromatographie über Biogel P6 und P60 gereinigt.

Als Antikörper dienten Kaninchenantisera der Fa. Calbiochem.

Zur Trennung von antikörpergebundenen und freiem Antigen wurde die Doppelantikörpermethode angewandt. Das Antiserum dazu wurde durch Immunisierung einer Ziege gegen Kaninchenglobulin gewonnen.

Durch Änderungen des Eiweißgehalts des Puffers, des Inkubationsvolumens, der Tracermengen, der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur konnte die Empfindlichkeit der Assays beeinflusst werden. Für hTSH- α liegt die untere Nachweisgrenze bei 50 pg/ml, für hTSH- β bei 20 pg/ml. Damit sind bei 98 % der Patienten die Untereinheiten bestimmbar geworden.

α -Ketten Präparationen von LH, FSH, HCG zeigten die gleiche prozentuale Verdrängung am Anti- α Antikörper wie α -TSH. LH kreuzreagiert im Assay zu 22 %. Der β -TSH Radioimmunoassay ist weitgehend spezifisch, TSH kreuzreagiert zu 5 %.

Die rechnerische Auswertung erfolgte mittels Spline-Approximation auf dem Computer Siemens 4004. Präzision und Richtigkeit entsprechen allgemein geforderten Kriterien.

Die Serumspiegel von α - und β -Untereinheiten zeigten gegenüber TSH kein diskordantes Verhalten, weder hinsichtlich der basalen Werte noch der durch den Releasing Faktor TRH stimulierten Werte bei 24 untersuchten Patienten mit endokriner Ophthalmopathie.

Die Spiegel der hormonspezifischen β -kette bei allen untersuchten Gruppen wie Patienten mit e.O., Hyperthyreose, "subklinischer" Hyper- und Hypothyreose, autonomen Adenomen und Euthyreose waren ausschließlich abhängig von der aktuellen Schilddrüsenfunktion.

15. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kourides, I.A.; Weintraub, B.D.; Ridgway, E.C.;
Maloof, F.:
Pituitary Secretion of Free Alpha and Beta Subunit
of Human Thyrotropin in Patients with Thyroid Disorders.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 40: 872 - 885, 1975
2. Kourides, I.A.; Weintraub, B.D.; Ridgway, E.C.;
Maloof, F.:
Increase in the Beta Subunit of Human TSH in Hypo-
thyroid Serum after Thyrotropin Releasing Hormone.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 37: 836 - 840, 1973
3. Kourides, I.A.; Weintraub, B.D.; Levko, M.A.;
Maloof, F.:
Alpha and Beta Subunits of Human Thyrotropin:
Purification and Development of Specific Radioimmuno-
assays.
Endocrinology 94: 1.411 - 1.421, 1974
4. Cornell, J.S.; Pierce, J.G.:
The Subunits of Human Pituitary Thyroid Stimulation
Hormone.
J. of Biological Chemistry 248: 4.327 - 4.333, 1973
5. Pierce, J.G.; Lilly, E. lecture:
The Subunits of Pituitary Thyrotropin - Their Rela-
tionship to other Glykoprotein Hormones.
Endocrinology 89: 1.331 - 1.344, 1971
6. Vaitukaitis, J.L.; Ross, G.T.; Pierce, J.G.;
Cornell, J.S.; Reichert, L.E.:
Generation of Specific Antisera with the Hormone-
Specific Beta-Subunit of hTSH or hFSH.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 653 - 658, 1973

7. Playfair, J.H.L.; Hurn, B.A.L.; Schulster, D:
Production of Antibodies and Binding Reagents.
Br. Med. Bull. 30: 24 - 31, 1974
8. Lader, S.; Hurn, B.A.L.; Court, G.:
A Comparative Assessment of Immunisation Procedures
for RIA.
Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures
in Clinical Medicine and Research 1973
Sonderdruck der International Atomic Energy Agency
SM - 177 / 10
9. Katalin, M.; Kocsár, L.T.:
Some Problems of Specific Antibody Production and
Control in Radioimmunoassay Techniques.
Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures
in Clinical Medicine and Research 1973
Sonderdruck der International Atomic Energy Agency
SM - 177 / 5
10. v. zur Mühlen, A.; Emrich, D.:
Zur Methodik der radioimmunchemischen Bestimmung von
menschlichem thyreotropen Hormon (hTSH)
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 9: 257 - 265, 1971
11. Skelly, D.S.; Brown, L.P.; Besch, P.K.:
Radioimmunoassay.
Clinical Chemistry 19: 146 - 185, 1973
12. Greenwood, F.C.; Hunter, W.M.:
The Preparation of ^{131}I -Labelled Human Growth Hormone
of High Specific Radioactivity.
Biochem. J.: 89: 114 - 123, 1963

13. Erhardt, F.; Marschner, I.; Pickardt, R.C.;
Scriba, P.C.:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmuno-
logischen Thyrotropin-Bestimmung.
Z. Klin. Chem. Biochem. 11: 381 - 387, 1973
14. Erhardt, F.W.; Scriba, P.C.:
Probleme der radioimmunologischen hTSH-Bestimmung.
Ärztl. Lab. 20: 191 - 198, 1974
15. Felber, J.P.:
Radioimmunoassays.
In: Clinical Biochemistry - Principles and Methods -
p. 324 - 367, Ed. Curtius, H.C., Roth, M.,
Verlag de Gruyter, Berlin 1974
16. Utiger, R.D.; Winokur, A.:
The Subcellular Distribution of Thyrotropin Releasing
Hormone (TRG) in Rat Hypothalamus and Brain
In: Thyroid Research (1976) Edited by Robbins, J., et al.
Amsterdam
17. Hunter, W.M.:
Radioimmunoassay
In: Handbook of Experimental Immunology, Second Edition
(1973) Edited by Weir, D.M., Blackwell Scientific Publi-
cations Oxford/London/Edinburgh/Melbourne, Chapter 17
18. Ouchterlony, Ö.:
Handbook of Immunodiffusion and Immunelectrophoresis,
Sixth Edition, Edited by Ann Arbor Science publ. 1973
19. Kourides, I.A.; Weintraub, B.D.; Matorana, M.A.L.;
Maloof, F.:
Alpha Subunit Contamination of Human Albumin Prepara-
tions: Interference in Radioimmunoassay.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 919 - 923, 1976

20. Odell, W.D.; Ross, G.T.; Rayford, P.L.:
Radioimmunoassay for Luteinizing Hormone in Human
Plasma or Serum: Physiological Studies.
J. of Clinical Investigation 46: 248 - 255, 1967
21. Huber, W.; Mann, K.; Karl, H.J.:
Anwendung eines Computerprogramms zur Berechnung
radioimmunologischer Meßwerte.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17: 241 - 246, 1979
22. Marschner, I.; Dobry, I.H.; Erhardt, F.W.;
Landesdorfer, T.; Popp, B.; Ringel, C.; Scriba, P.C.:
Berechnungen radioimmunologischer Meßwerte mittels
Spline Funktion.
Ärztl. Lab. 20: 184 - 191, 1974
23. Rodbard, D.:
Statistical Quality Control and Routine Data Proces-
sing for Radioimmunoassay and Immunoradiometric Assays.
Clin. Chemistry 20: 1.255 - 1.270, 1974
24. Sachs, L.:
Angewandte Statistik
3. Auflage (1973)
Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York
25. Kohn, L.D.; Winand, R.J.:
Structure of an Exophthalmos-producing Factor Derived
from Thyrotropin by Partial Pepsin Digestion.
Journal of Biological Chemistry 250: 6.503 - 6.508,
1975
26. Edmonds, M.; Molitch, M.; Pierce, J.G.; Odell, W.D.:
Secretion of Alpha Subunit of LH by the Anterior
Pituitary.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 551 - 555, 1975

27. Hagen, C.; McNeilly, A.S.:
Changes in Circulating Levels of LH, FSH, LH β and
 α -Subunit after Gonadotropin - Releasing Hormone,
and of TSH, LH β and α -Subunit after Thyrotropin
Releasing Hormone.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 466 - 470, 1975
28. Kourides, I.A.; Re, R.N.; Weintraub, B.D.;
Ridgway, E.C.; Maloof, F.:
Metabolic Clearance and Secretion Rates of Subunits
of Human Thyrotropin.
J. of Clinical Investigation 59: 508 - 516, 1977
29. Benevise, R.; Frohmann, L.A.; Bell, J.; Spitz, J.;
Rabinowitz, D.:
Alpha-Subunit of Glykoprotein-Hormone: Presence in
Peripheral Serum after LHRH.
Europ. J. Clin. Investigation 5: 123 - 131, 1975
30. Kourides, I.A.; Weintraub, B.D.; Re, R.N.;
Ridgway, E.C.; Maloof, F.:
Thyroid Hormone, Oestrogen, and Glucocorticoid
Effects on two different Pituitary Glycoprotein
Hormone Alpha Subunit Pools.
Clinical Endocrinology 9: 535 - 542, 1978
31. Hagen, C.; McNeilly, A.S.:
The Specific and Application of a Radioimmunoassay
for the α -Subunit of Luteinizing Hormone in Man.
Acta Endocrinologica 78: 664 - 674, 1975
32. Ridgway, E.C.; Weintraub, B.D.; Maloof, F.:
Metabolic Clearance and Production Rates of Human
Thyrotropin.
J. of Clinical Investigation 53: 895 - 903, 1974

33. Rosen, S.W.; Weintraub, B.D.:
Ectopic Production of the isolated alpha Subunit
of the Glycoprotein Hormones.
New England Journal of Medicine 290: 1.441 - 1.447,
1974
34. Kourides, I.A.; Weintraub, B.D.; Rosen, S.W.;
Ridgway, E.C.; Kliman, B.; Maloof, F.:
Secretion of Alpha Subunit of Glycoprotein Hormones
by Pituitary Adenomas.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 97 - 106, 1976
35. Bardwell, C.G.; Mac Farlane, J.A.; Robinson, E.L.;
Shalet, S.M.:
Glycoprotein Hormone alpha-Subunit and Thyroid
Function in Breast Cancer.
Acta Endocrinologica 225: 39 - 42, 1979
36. Cove, D.H.; Smith, S.C.H.; Walker, R.; Howell, A.:
The Synthesis of the Glycoprotein Hormone alpha Subunit
by Human Breast Carcinomas.
European J. Cancer 15: 693 - 696, 1979
37. Blackman, M.; Gershengorn, M.C.; Weintraub, B.D.:
Excess-Production of Free Alpha-Subunits by Mouse
Pituitary Thyrotropic Tumor Cells in Vitro.
Endocrinology 102: 499 - 508, 1978
38. Re, R.N.; Kourides, I.A.; Ridgway, E.C.; Weintraub,
B.D.; Maloof, F.:
The Effect of Glucocorticoid Administration of Human
Pituitary Secretion of Thyrotropin and Prolactin.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 338 - 346, 1976

39. Werner, S.C.:
Classification of the Eye Changes of Grave's
Disease.
J. Clin. Endocr. 29: 982 - 984, 1969
40. Mann, K.; Schöner, W.; Maier-Hauff, K.; Rothe, R.;
Jüngst, D.; Karl, H.J.:
Vergleichende Untersuchungen der endokrinen Ophthalmo-
pathie mittels Ultrasonographie, Computertomographie und
Fischbioassay.
Klin. Wochenschrift 57: 831 - 837, 1979
41. Chopra, I.J.; Chopra, U.; Orgiazzi, J.:
Abnormalities of Hypothalamo-Hypophyseal-Thyroid Axis
in Patients with Grave's Ophthalmopathie.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 955 - 967, 1973
42. Vanheest, L.; Golstein-Golaire, J.:
Gel Filtration Profile of Immunoreactive Thyrotropin
and Subunits of Human Pituitaries.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43: 836 - 841, 1976
43. Bigos, S.T.; Ridgway, E.C.; Kourides, I.A.;
Maloof, F.:
Spectrum of Pituitary Alterations with Mild and
Severe Thyroid Impairment.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46: 317 - 325, 1978
44. Kourides, I.A.; Ridgway, E.C.; Weintraub, B.D.;
Bigos, S.T.; Gershengorn, M.C.; Maloof, F.:
Thyrotropin-Induced Hyperthyroidism: Use of Alpha
and Beta Subunit to Identify Patients with Pituitary
Tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45: 534 - 543, 1977

45. Hagen, C.; McNatty, K.P.; McNeilly, A.S.:

Immunoreactive α - and β -Subunits of Luteinizing Hormone in Human Peripheral Blood and Follicular Fluid throughout the Menstrual Cycle, and their Effect on the Secretion Rate of Progesterone by Human Granulosa Cells in Tissue culture.

J. Endocr. 69: 33 - 46, 1976

46. Dimond, R.C.; Rosen, S.W.:

Chromatographic Differences between Circulating and Pituitary Thyrotropins.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 316 - 325, 1974

16. ANHANG

Nomenklatur

b	=	bovin
h	=	human
TSH	=	Thyreoideastimulierendes Hormon
FSH	=	Follikelstimulierendes Hormon
LH	=	Luteinisierendes Hormon
HCG	=	Human Chorionic Gonadotropin
a	=	alpha-Untereinheit
B	=	beta-Untereinheit
RIA	=	Radioimmunoassay
T ₃	=	Trijodthyronin
T ₄	=	Thyroxin
TBI	=	Thyroxinbindungsindex
TRH	=	Thyrotropin Releasing Hormon
eO	=	endokrine Ophthalmopathie
BSA	=	bovines Serum Albumin
HSA	=	humanes Serum Albumin
Ci	=	Curie
C	=	Counts
EDTA	=	Äthylendiamintetraessigsäure
Tracer	=	markiertes Antigen
B ₀	=	arithmetischer Mittelwert der Zählrate des Standardleerwertes, d.h. ohne Zugabe unmarkierten Antigens
B	=	arithmetischer Mittelwert der Zählrate der Standardprobe bzw. der spezifischen anti-körpergebundenen Aktivität
T = GA	=	arithmetischer Mittelwert der Gesamtzählrate der Tracermenge

Puffer und Reagenzien

Puffer I 0,05 M 0,1 M NaCl pH 7,5

81,75 ml Stammlösung A:

0,68 g KH_2PO_4 auf 100 ml H_2O

418,65 ml Stammlösung B:

4,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 500 ml H_2O

mit 0,1 N NaOH auf pH 7,5 titrieren

RIA-Puffer II pH 7,5

1 l 0,01 M Phosphatpuffer

10 g BSA (= 1 %)

8,77 g NaCl (= 0,15 M)

(3,72 g EDTA -Titriplex)

Phosphatpuffer 0,4 M pH 7,5

162,5 ml Stammlösung A:

10,89 g KH_2PO_4 auf 200 ml H_2O

837,5 ml Stammlösung B:

71,20 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1.000 ml H_2O

Phosphatpuffer 0,5 M pH 7,5

Stammlösung A:

6,81 g KH_2PO_4 auf 100 ml H_2O

Stammlösung B:

44,50 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 500 ml H_2O

soviel von A zu B geben bis pH 7,5 eingestellt ist

- Freudsches Adjuvans komplett und inkomplett:
Difco Laboratorium Detroit
- Tuberkelbazillen: Mycobakterium tuberculosis No. 437 RA
freundlich zur Verfügung gestellt von
Prof. Ruckdeschel, Institut für Mikrobiologie,
Max von Pettenkofer-Straße
- Bordetella - Pertussis - Vakzine: Behringwerke, Marburg
- Nembutal: Boehringer, Ingelheim
- Stabilisierendes Kaninchenserum: Behringwerke, Marburg
- bovines Serumalbumin: Roth, Karlsruhe
- Biogel P6 / P60: Biorad, München
- Kaninchen-Gammaglobulin: Serva, Heidelberg
- Kälberserum: Schlachthof München
- Hormonpräparationen: Calbiochem kalifornien
- Na¹²⁵I: Behringwerke, Marburg
- TSH MRC: National Institute for Biological Standards
and Control, Holly Hill, Hampstead, London
- TRH Relefact: Hoechst, Frankfurt
- sämtliche Laborreagenzien: Merck, Darmstadt

L e b e n s l a u f

Am 03.04.1954 wurde ich als Tochter des Amtsinspektor Josef Jansen und seiner Ehefrau Elisabeth in Landshut geboren.

Von 1960 - 1964 besuchte ich die Volksschule Seligenthal in Landshut. Im September 1964 trat ich in das Gymnasium Seligenthal ein und legte dort im Juni 1973 die Reifeprüfung ab.

Im November 1973 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier legte ich im August 1975 die ärztliche Vorprüfung ab.

Von Oktober 1976 bis Ende 1978 arbeitete ich als Doktorantin bei Herrn Professor Karl an der Medizinischen Klinik II im Klinikum Großhadern an vorliegender Dissertation.

Im Oktober 1979 beendete ich mein Studium mit der ärztlichen Prüfung und erhielt am 26.11.1979 die Approbation als Ärztin.

Seit Februar 1980 bin ich am Radiologischen Zentrum des Klinikums Nürnberg als Assistenzärztin beschäftigt.

Im Mai 1980 heiratete ich den Dipl.-Ing. Gottfried Eder.

